

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Aneta Šimáčková

Význam morfologických, ultrastrukturních a molekulárních analýz pro vyšší systematiku
nálevníků

Importance of morphological, ultrastructural, and molecular analyses for the higher
taxonomy of ciliates

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Ivanovi Čepičkovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za jeho cenné rady a vstřícnost.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1.6.2020

Aneta Šimáčková

Abstrakt

Nálevníci jsou jednou z největších skupin protist. Mají tři charakteristické vlastnosti – (1). přítomnost mnoha bičíků, jimiž je pokryta buňka, (2). jaderný dualismus a (3). konjugaci. Systematika kmene Ciliophora se od jeho založení velmi změnila. To zapříčinil rozvoj nových metod, kterými se nálevníci mohli studovat. První systémy byly založeny na základě morfologie struktur v orální oblasti. Na základě těchto struktur vydali Levine a kolektiv v roce 1980 systém nálevníků, v kterém rozdělili nálevníky do tří tříd. Zjistilo se, že tento systém není přirozený, jelikož orální struktury jsou variabilní. Jako lepší znak pro evoluci nálevníků se osvědčila somatická ultrastruktura. Systém na základě ní vydali Small a Lynn, kteří vytvořili v kmenu Ciliophora tři podkmeny a osm tříd. Molekulární analýzy tento systém nepotvrdily. Na základě nich se ukázala existence pouze dvou podkmenů (Postciliodesmatophora a Intramacronucleata) a počet tříd se zvýšil na jedenáct. Od té doby bylo definováno dalších 6 nových tříd nálevníků. Tyto třídy byly vytvořeny především na základě fylogenomických a fylogenetických analýz. V podmenu Intramacronucleata byly pomocí fylogenomických analýz odhaleny tři evoluční linie SAL, CONthreeP a Protocruzia.

Klíčová slova: nálevník, systém, orální ciliatura, somatická ciliatura, molekulární data, kinetidy

Abstract

Ciliophora are one of the largest groups of protists. They have three typical features – (1). the presence of many cilia, covering the cell, (2). nuclear dualism, and (3). conjugation. The systematics of the phylum Ciliophora has changed greatly during the last decades. This was caused by the development of new methods used for studying the ciliates. The first systems were based on the morphology of structures in the oral region. Based on these structures, Levine et al. published a system of ciliates in 1980, which they divided into three classes. However, it was found later that this system was not natural because oral structures do not reflect the phylogeny, and the structure of somatic structures was shown to be a more useful feature. Small and Lynn created a system based on the structure of somatic kinetids, where they divided the ciliates into three subphyla and eight classes. However, subsequent molecular analyses did not support this system. They divided the ciliates into two subphyla (Postciliodesmatophora and Intramacronucleata), and the number of classes was elevated to eleven. Today, additional six new classes of ciliates are recognised. They were created mainly on the basis of phylogenomic and phylogenetic analyses. The classes of the subphylum Intramacronucleata are grouped into three lines of evolution on the basis of phylogenetic analyses SAL, CONthreeP and Protocruzia.

Keywords: ciliate, system, oral ciliature, somatic ciliature, molecular data, kinetids

Obsah

1. Úvod a cíle	1
2. Stavba buňky nálevníka	2
3. Jak technika ovlivnila systém nálevníků.....	7
4. Systém na základě orální ciliatury	8
5. Systém na základě ultrastruktury somatické infraciliatury	10
6. Systém na základě molekulárních analýz	11
6.1. Sjednocení systémů	12
6.2. Podkmen Postciliodesmatophora.....	15
6.2.1. Třída Karyorelictea	15
6.2.2. Třída Heterotrichea	15
6.3. Podkmen Intramacronucleata	15
6.3.1. Třída Litostomatea	15
6.3.2. Třída Phyllopharyngea	16
6.3.3. Třída Nassophorea.....	17
6.3.4. Třída Colpodea	17
6.3.5. Třída Oligohymenophorea	17
6.3.6. Třída Spirotrichea.....	18
6.3.7. Třída Prostomatea	19
6.3.8. Třída Plagiopylea	19
6.3.9. Třída Armophorea	19
6.4. Nově vytvořené třídy nálevníků	20
6.4.1. Třída Protocruzia	21
6.4.2. Třída Mesodinica.....	21
6.4.3. Třída Cariatotrichea	22
6.4.4. Třída Odontostomatea	22
6.4.5. Třída Muranotrichea.....	22
6.4.6. Třída Parablepharisma	23
6.5. Fylogenetické vztahy mezi třídami nálevníků.....	23
7. Závěr	26
8. Přehled literatury.....	27

1. Úvod a cíle

Nálevníci (Ciliophora) jsou významnou a nejstudovanější skupinou volně žijících jednobuněčných eukaryotických organismů – protist. Vyvinuli se přibližně před jednou miliardou let a nejstarší nalezená fosilie je stará zhruba 580 milionů let (Li et al. 2007; Lynn 2008). Název Ciliophora zavedl Doflein až v roce 1901, původně se nálevníci označovali jako Infusoria z toho důvodu, že byli nejlépe pozorovatelní ve vzorcích (infuzích) z vegetace (viz Bennett et al. 2017).

Nálevníci mají velmi velkou diverzitu a patří k největším skupinám protist vzhledem k počtu druhů (Corliss 2004). Odhaduje se, že existuje až 30 000 volně žijících druhů a doposud jich bylo popsáno více než 8 000 (Adl et al. 2007; Lynn 2008). Nálevníci se vyskytují téměř po celé Zemi a většina je volně žijících. Mohou žít v kyslíkatém i v bezkyslíkatém prostředí. Nalezneme je ve sladkých i slaných vodách, čistých i znečištěných. Nachází se také ve vlhké půdě. Mezi nálevníky jsou i endosymbiotické nebo parazitické druhy. Příkladem je *Balantidium coli*, což je jediný známý parazitický nálevník lidí. Způsobuje balantidiózu, která může být pro lidi až smrtelná (perforace tlustého střeva). Obvykle se *Balantidium coli* vyskytuje jako komenzál ve střevech prasat. Od těch se člověk nejčastěji nakazí. (Schuster a Ramirez-Avila 2008).

Stavba buněk nálevníků je velmi složitá. Vyznačují se jaderným dualismem, což znamená, že mají minimálně dvě jádra, mikronukleus a makronucleus, která se liší svým vzhledem a funkcí. Dalšími charakteristickými znaky nálevníků je přítomnost mnoha bičíků, které pokrývají povrch buňky, a konjugace, což je typ pohlavního procesu typický pro tento kmen.

Kmen Ciliophora je zařazen mezi Alveolata do skupiny SAR. Tato skupina obsahuje kromě alveolát další dvě linie, Stramenopiles a Rhizaria, které k sobě byly přiřazeny prostřednictvím fylogenetických analýz (Burki et al. 2007). Alveolata se dále dělí na Myxozoa, Colponema a Ciliophora (viz Janouskovec et al. 2017). Společným znakem všech alveolát je přítomnost plochých vakuol (kortikálních alveolů) pod jejich plasmatickou membránou.

Systém nálevníků se v průběhu let velmi měnil. Došlo k tomu vlivem rozvoje nových mikroskopických technik, kultivačních postupů a molekulárních metod. Stále se získávají nové informace a data, které pomáhají zdokonalovat tento systém. A jako v mnoha skupinách, i v tomto kmenu existují nejasnosti ve fylogenetických vztazích mezi jednotlivými skupinami. Přesto, že jsou nálevníci studováni již mnoho let, stále se nachází nové druhy a taxony.

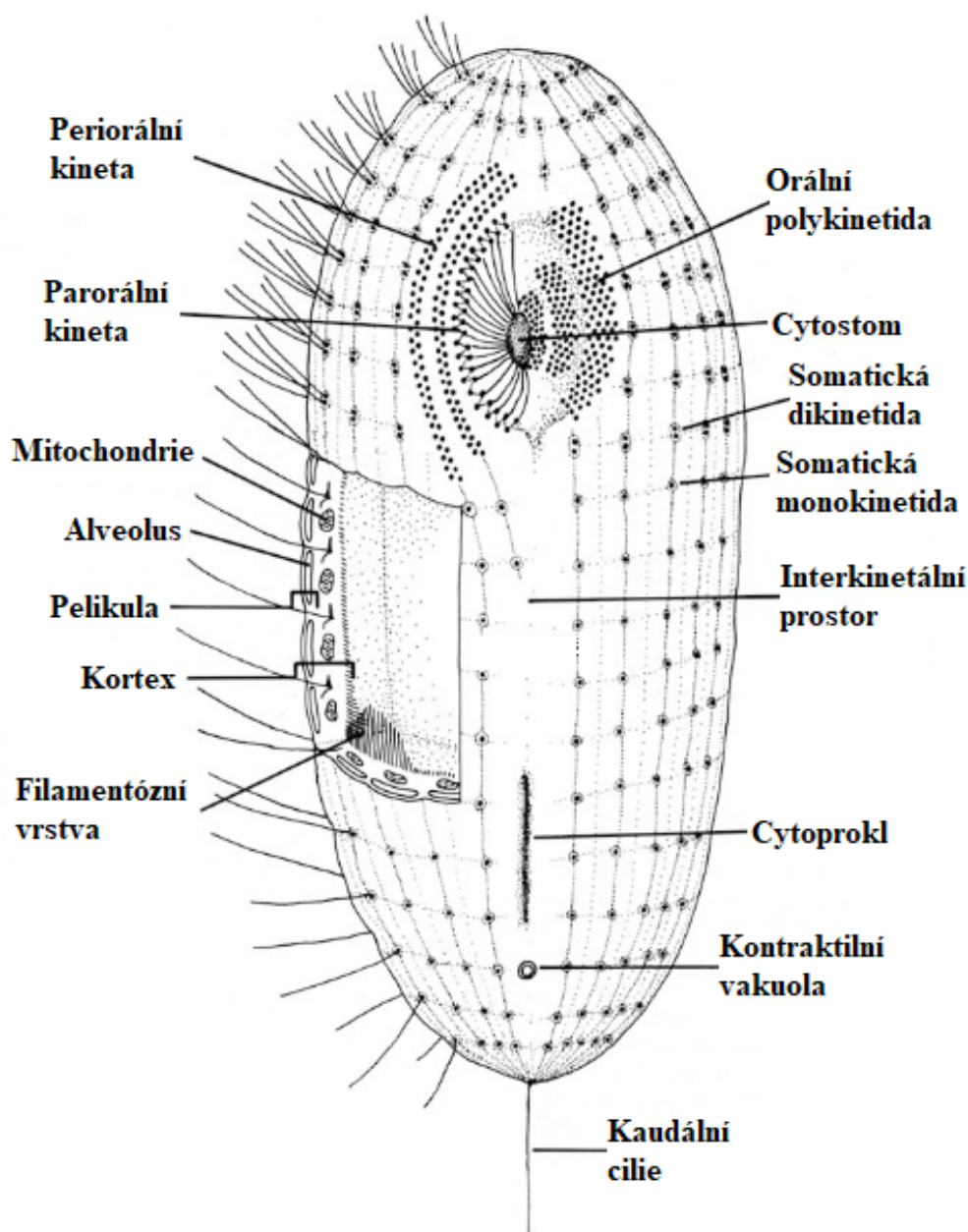
Cílem této práce je shrnout poznatky o proměnlivosti vyšší systematiky nálevníků přibližně od roku 1980 do současnosti. Dále uvést znaky, na základě kterých byli a jsou nálevníci rozdělováni do skupin. Určit, jaké mají mezi sebou fylogenetické vztahy a proč u některých skupin stále neznáme jejich přesnou fylogenetickou pozici. Popsat skupiny (třídy) nálevníků, u kterých můžeme očekávat změny v systematice.

2. Stavba buňky nálevníka

Struktura buněk hrála a stále hraje velkou roli v rozdělování nálevníků do skupin i přesto, že se v současné době využívají k určení fylogenetických vztahů především molekulární data. Tato kapitola poskytuje základní informace o strukturách, kterými se dále budu zabývat.

Nálevníci mají typicky eukaryotickou buňku s buněčným jádrem, membránovými organelami, cytoskeletem a cytoplazmatickou membránou, která ohraničuje buňku. Pro tuto práci jsou však nejdůležitější struktury bičíkového aparátu a jader nálevníka.

Nálevníci jsou jednobuněčné organismy s obvyklou velikostí od 10 μm do 4500 μm . Existují ale i některé mnohem větší druhy, jako je *Zoothamnium niveum*, který dosahuje velikosti až 1,5 cm (Rinke et al. 2006). Nálevníci mají alespoň v nějaké části svého života cilie (bičíky) (Lynn 1981). Ty obvykle pokrývají celou buňku nálevníka. Soubor bičíků nálevníka je tzv. ciliatura. Jednotlivé skupiny se liší počtem cilií a jejich uspořádáním na buňce. Tato variabilita uspořádání cilií v minulosti byla a je i nadále důležitá pro rozdělování nálevníků do hlavních skupin (Lynn 2008).

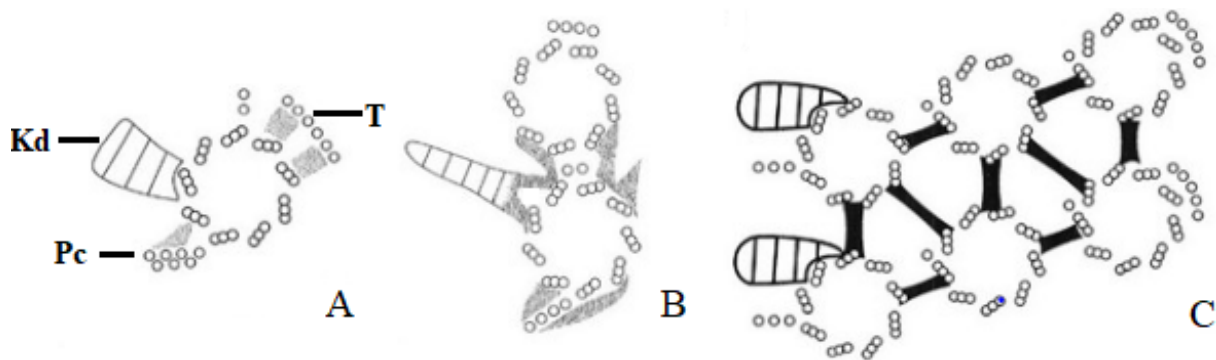


Obr. 1. Stavba buňky nálevníka; upraveno z (Lynn a Small 1990).

Tvar buňky udržuje kortex, což je povrchová vrstva buňky (viz **Obr. 1.**). Skládá se ze dvou hlavních částí, pelikuly a kinetidových struktur. Součástí pelikuly je cytoplazmatická membrána, pod kterou jsou umístěny ploché vakuoly nazývané kortikální alveoly. Alveoly zajišťují iontovou regulaci v buňce (Stelly et al. 1995). U zástupců rodu *Coleps* jsou v alveolách desky z uhličitanu vápenatého. Tyto desky jsou na buňce uspořádány jako brnění a slouží nejpravděpodobněji k ochraně nebo zpevnění buňky (Lemloh et al. 2013). Pod alveoly se nachází další část pelikuly, kterou je vláknitá vrstva epiplazma (Damaj et al. 2009).

Kinetidy jsou hlavní složkou kortexu nálevníka a základní jednotkou pohybu. Jejich důležitou součástí jsou kinetozomy (bazální tělíska), ze kterých vyrůstají cilie. Kinetidy můžeme rozdělit do dvou skupin, na orální a somatické, podle jejich polohy na buňce. Orální kinetidy se nachází kolem cytostomu (buněčných úst) a jejich cilie slouží především k získávání a nahánění potravy. Mohou sloužit i k pohybu, jako je tomu u podtřídy *Choreotrichia* (třída *Spirotrichea*) (Small a Lynn 1985). K pohybu a přichycování se k povrchům používají nálevníci cilie somatických kinetid. Ty jsou na těle nálevníka uspořádány do podélných nebo spirálních řad zvaných kinety (de Puytorac, Grain, a de Santa Rosa 1976).

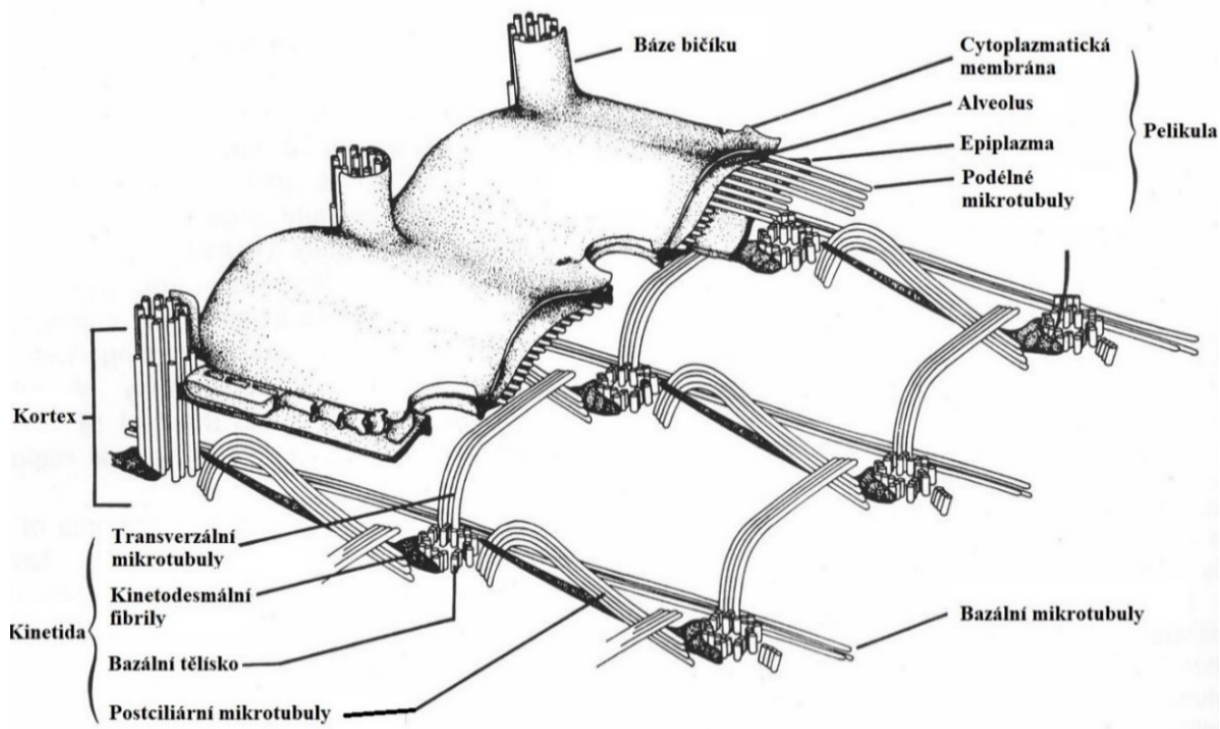
U nálevníků existují tři uspořádání somatických kinetid. Jsou to monokinetidy, dikinetidy a polykinetidy (viz **Obr. 2**). Monokinetidy jsou tvořeny jedním kinetozomem, ze kterého vychází jedna cilie, a cytoskeletárním aparátem. Mezi nálevníky se vyskytují různé vzorce monokinetid. Základní jsou čtyři, a to u tříd *Litostomatea*, *Phyllopharyngea*, *Oligohymenophorea* a *Nassophorea* (Lynn 1981). Dikinetidy se skládají ze dvou kinetozomů, dvou cilií a fibrilárního aparátu. Vyskytují se v několika vzorcích u tříd: *Heterotrichia*, *Karyorelictea*, *Colpodea* a *Spirotrichea*. Polykinetidy se skládají z více než dvou kinetozomů a cilií. Struktury těchto kinetid byly popsány jen u mála skupin. Vyskytují se u třídy *Spirotrichea* a u některých členů třídy *Oligohymenophorea* (Bennett et al. 2017; Lynn 1981; Small a Lynn 1981). Somatické kinetidy mohou být různě modifikované. U některých skupin jsou přizpůsobeny tak, aby se buňky mohly lépe přichycovat k povrchům a substrátům (Corliss 1998; Lynn 2008). V blízkosti orální oblasti se mohou vyskytovat jako periorální kinetidy, které mají složitější strukturu a pomáhají získávat potravu (viz **Obr. 1**) (Lynn 2008). Další modifikací jsou cirri, které jsou složeny z mnoha somatických bičíků. Bičíky pak fungují jako jeden celek, slouží především k pohybu, ale mohou napomáhat i k získání potravy (Roth 1957). Cirri se vyskytují nejčastěji u členů třídy *Spirotrichea* (de Puytorac et al. 1976). U některých skupin došlo ke značné redukci somatické ciliatury a povrch jejich buňky je částečně nebo úplně holý. Je to například u zástupců řádu *Tintinnida* (třída *Spirotrichea*), třídy *Odontostomatea* a podtřídy *Rhynchodia* (třída *Phyllopharyngea*) (Lynn 2008).



Obr. 2. Příklady somatické ciliatury nálevníků. A. Monokinetida, B. dikinetida, C. polykinetida; kinetodesmální fibrily (Kd), postciliární mikrotubuly (Pc), transversální mikrotubuly (T). Upraveno z (Lynn 2003).

Orální kinetidy se také vyskytují ve formě monokinetid, dikinetid nebo polykinetid. Zástupci s orálními monokinetidami jsou často ze třídy Litostomatea (např. rody *Alloiozona*, *Balantidium*). Orální dikinetidy se vyskytují nejčastěji. Je to např. u tříd Phyllopharyngea, Heterotrichea a Spirotrichea. Orální polykinetidy se skládají obvykle z více než šesti kinetozomů. Neliší se pouze počtem kinetozomů, ale i jejich propojením. Tvoří složité vzorce, ve kterých mohou být kinetozomy uspořádané (např. u tříd Nassophorea, Colpodea a Litostomatea) nebo neuspořádané (u třídy Spirotrichea) (Lynn 1976, 1981). Orální polykinetidy uspořádané do řad tvoří u některých druhů membranely (např. u některých Oligohymenophorea a Armophorea). Ty se uplatňují při získávání potravy, ale mohou sloužit i k pohybu (Williams a Frankel 1973).

Kromě cilií jsou součástí kinetidy mikrotubulární a nemikrotubulární struktury, které navzájem propojují kinetozomy a kinety (Allen 1971) (viz **Obr. 3**). Tyto struktury zpevňují buňku a určují charakteristický tvar každého nálevníka. Změna uspořádání kinetozomů nebo jejich propojení by ovlivnila tvar buňky (Lynn 1981, 2012). První z těchto struktur jsou nemikrotubulární kinetodesmální fibrily, které jsou rovnoběžné s buněčným povrchem a mají příčné pruhování. Dalšími jsou postciliární mikrotubuly. Ty se u jednotlivých druhů liší v závislosti na úhlu, jež svírají s osou kinetidy (Williams a Frankel 1973). U některých druhů nálevníků se postciliární mikrotubuly překrývají a tvoří postciliodesmata, která se podílejí na prodlužování buňky (Lynn 2008). Třetí složkou bičíkového aparátu jsou transversální mikrotubuly, které se liší u jednotlivých druhů orientací vůči bazálnímu tělísku. Někdy jsou tyto kinetidy příliš malé na určení jejich orientace. Tak tomu je např. u Nassulida (Allen 1971; Peck 1977; Small a Lynn 1981). Poslední jsou bazální mikrotubuly. Ty se vyskytují podél somatických kinetid a nejsou se somatickými kinetidami přímo spojeny, tak jako to bylo u předchozích struktur (Lynn 1981).



Obr. 3. Schéma somatického kortexu nálevníků; upraveno z (Lynn 2008).

Pro buňku nálevníka jsou kromě přítomnosti cilií charakteristické i další znaky, například jaderný dualismus. Buňky nálevníků obsahují minimálně dvě jádra, která mají odlišné funkce, makronukleus se somatickou funkcí a diploidní mikronukleus s generativní funkcí (Allen 1967). Mikronukleus není transkripčně aktivní. Slouží především k uchování genetické informace a také se uplatňuje v rekombinaci. Mikronukleus se dělí mitózou nebo meiózou. Podílí se také na konjugaci (Allen 1967; Allen a Gibson 1972). Makronukleus je většinou mnohem větší než mikronukleus. Je to transkripčně aktivní jádro, které obsahuje tisíce kopií genů. Makronukleus se na rozdíl od mikronukleu dělí amitózou. Při dělení makronukleu i mikronukleu je jaderná membrána zachována (nerozpadá se) (Raikov 1985). Nepohlavně se nálevníci rozmnožují pomocí příčného dělení (Tucker 1967).

3. Jak technika ovlivnila systém nálevníků

Studiem nálevníků se lidé zabývají již mnoho let. První systémy byly založeny na základě morfologických znaků. Tak jako u jiných skupin protist se klasifikace nálevníků průběžně mění (viz *Tabulka 1*). S vývojem techniky se získává více a více informací o jejich struktuře a genetických vlastnostech a jsou formulovány nové fylogenetické hypotézy.

Tabulka 1. 1. systém na základě orální ciliatury (Levine et al 1980), 2. systém na základě somatických struktur (Small and Lynn 1981), 3. systém na základě molekulárních analýz (Lynn 2003).

Systém nálevníků Levine et al. 1980	Systém nálevníků Small a Lynn 1981	Systém nálevníků Lynn 2003
Třída KINETOFRAGMINOPHOREA	Podkmen POSTCILIODESMATOPHORA	Podkmen POSTCILIODESMATOPHORA
Podtřída Gymnostomatia	Třída Karyorelictea	Třída: Karyorelictea
Řád Prostomatida	Třída Spirotrichea	Třída: Heterotrichia
Řád Pleurostomatida	Podkmen RHABDOPHORA	Podkmen: INTRAMACRONUCLEATA
Řád Primociliatida	Třída Prostomea	Třída: Spirotrichea
Řád Karyorelictida	Třída Litostomea	Podtřída: Protocruziidia
Podtřída Vestibulifera	Podtřída Haptoria	Podtřída: Phacodiniidia
Řád Trichostomatina	Podtřída Vestibulifera	Podtřída: Hypotrichia
Řád Entodiniomorphida	Podkmen CYRTOPHORA	Podtřída: Oligotrichia
Řád Colpodida	Třída Nassophorea	Podtřída: Choreotrichia
Podtřída Hypostomatia	Podtřída Hypostomia	Podtřída: Stichotrichia
Řád Synhymeniida	Podtřída Polyhymenophoria	Podtřída: Licnophoria
Řád Nassulida	Třída Phyllopharyngea	Třída: Armophorea
Řád Cyrtophorida	Podtřída Phyllopharyngia	Třída: Litostomatea
Řád Chonotrichida	Podtřída Chonotrichia	Podtřída: Haptoria
Řád Rhynchodida	Podtřída Suctororia	Podtřída: Trichostomatia
Řád Apostomatida	Třída Colpodea	Třída: Phyllopharyngea
Podtřída Suctororia	Třída Oligohymenophorea	Podtřída: Phyllopharyngia
Řád Suctrida	Podtřída Hymenostomia	Podtřída: Rhynchodia
Třída OLIGOHYMENOPHOREA	Podtřída Peritrichia	Podtřída: Chonotrichia
Podtřída Hymenostomatia	Podtřída Astomia	Podtřída: Suctororia
Řád: Hymenostomatida	Podtřída Apostomia	Třída: Nassophorea
Řád: Scuticociliatida	Třída Colpodea	Třída: Colpodea
Řád: Astomatida	Třída Oligohymenophorea	Třída: Prostomatea
Podtřída Peritrichia	Podtřída Hymenostomia	Třída: Plagiopylea
Řád: Peritrichida	Podtřída Peritrichia	Třída: Oligohymenophorea
Třída POLYMENOPHOREA	Podtřída Astomia	Podtřída: Peniculia
Podtřída Spirotrichia	Podtřída Apostomia	Podtřída: Scuticociliatia
Řád: Heterotrichida	Třída Colpodea	Podtřída: Hymenostomatia
Řád: Odontostomatida	Třída Oligohymenophorea	Podtřída: Apostomatia
Řád: Oligotrichida	Podtřída Hymenostomia	Podtřída: Peritrichia
Řád: Hypotrichida	Podtřída Peritrichia	Podtřída: Astomatia

Na počátcích studie nálevníků byla klíčová světelná mikroskopie. Pomocí ní se rozdělovali nálevníci na jednodušší a složitější formy v závislosti na orální a somatické ciliatuře (viz Lynn

2008). Ve 20. století se začaly používat různé techniky barvení kortexu a dalších struktur nálevníka. Mezi ty hlavní patří barvení pomocí stříbra (Fernandez-Galiano 1976; Ng a Nelsen 1977). Tímto barvením se získala data o infraciliatuře nálevníků. Zásadní bylo zjistit podrobné informace o kinetidách (Frankel a Heckmann 1968). V polovině 20. století se v systematice nálevníků začala používat transmisní a skenovací elektronová mikroskopie. Získaná data dostala v systematice přednost před dříve používanými daty pořízenými pomocí barvicích technik. Jejím používáním se získala zcela nová data, která poskytovala informaci o ultrastruktuře buňky nálevníků (Corliss 1979). Byla důležitá především pro určení vyšší systematiky nálevníků. Na základě údajů z elektronové mikroskopie nastala mohutná revize systému nálevníků (Small a Lynn 1981).

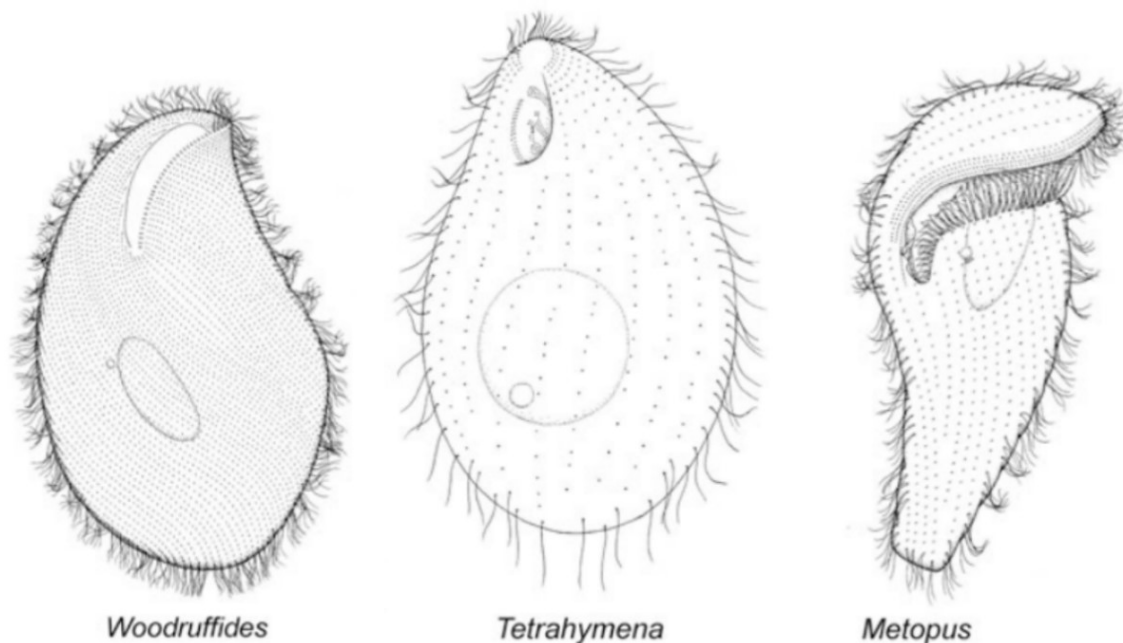
Další revize systému nastala v 90. letech 20. století, kdy se začaly plně využívat molekulární analýzy. Byla to data získaná především ze sekvencí genů pro molekuly RNA v malé a velké ribozomální podjednotce (SSU rRNA a LSU rRNA). Na základě těchto sekvencí se ukázalo, že v kmenu Ciliophora existuje obrovská genetická rozmanitost (Baroin et al. 1988). Geny pro ribosomální RNA byly pro studii nálevníků zvoleny, jelikož jejich sekvence jsou v evoluci velmi dobře konzervované (Israel et al. 2002). Na základě genových sekvencí se začaly sestavovat fylogenetické stromy. Ty nám poskytly další podstatné informace o fylogenetických systémech založených pouze na jednom genu, ale častěji se začaly používat multigenové a fylogenomické analýzy (Huang et al. 2016).

4. Systém na základě orální ciliatury

V roce 1980 vydali Levine a jeho kolektiv nový systém protist, v němž se věnovali i nálevníkům (viz **Tabulka 1**) (Levine et al. 1980). Nálevníci byli studováni již mnoho let předtím. Tento systém byl poslední, kde byla jako hlavní znak pro rozdělení použita orální ciliatura, ze které plynou i názvy pro jednotlivé taxony. Při tvoření tohoto systému se kladl důraz především na struktury, které byly viditelné pomocí světelné mikroskopie. Ultrastrukturní data, která již byla v této době dostupná, působila nesrovnalosti v jejich systému. Proto je v některých případech zanedbali (viz Small a Lynn 1981).

V tomto systému tvořily kmen Ciliophora tři třídy: Kinetofragminophorea, Oligohymenophorea a Polyhymenophorea (viz **Obr. 4**). Zástupci třídy Kinetofragminophorea mají orální ciliaturu velmi jednoduchou. Oligohymenophorea mají orální ciliaturu dobře odlišenou od somatické ciliatury. Orální ciliatura je u nich tvořena třemi polykinetidami nebo

membranelami. Poslední třída Polyhymenophorea, se vyznačují složitou, mohutně vyvinutou orální ciliaturou. Od orální ciliatury předchozí třídy se liší tím, že zástupci této třídy mají více než tři membranely (John O. Corliss 1974; Levine et al. 1980).



Obr. 4. Zástupci tří tříd v kmenu Ciliophora: Kinetofragminophorea (*Woodruffides*), Oligohymenophorea (*Tetrahymena*), Polyhymenophorea (*Metopus*). Upraveno z (Bennett et al. 2017).

Třída Kinetofragminophorea obsahovala tři podtřídy: Gymnostomatia, Vestibulifera a Hypostomatia. Zástupci podtřídy Gymnostomatia nyní patří do odlišných tříd, konkrétně Prostomatea, Oligohymenophorea a Karyorelictea. Stejně tak je to u dalších dvou podtříd. Členové podtřídy Vestibulifera v současnosti patří do tříd Litostomatea a Colpodea. A členové podtřídy Hypostomatia do tříd Phyllopharyngea, Nassophorea a Oligohymenophorea. Třída Oligohymenophorea zahrnovala dvě podtřídy, Hymenostomatia a Peritrichia. Obě tyto podtřídy s úpravami stále patří do třídy Oligohymenophorea. Poslední třída Polyhymenophorea obsahovala pouze jednu podtřídu, kterou byla Spirotrichia (Adl et al. 2019; Levine et al. 1980). Tato podtřída zahrnovala zástupce dnešních tříd, a to Heterotrichea, Armophorea, Spirotrichea a Odontostomatea (Adl et al. 2019; Fernandes et al. 2018).

Tento systém na základě orálních struktur nemůžeme dnes považovat za přirozený. Pomocí těchto struktur byly k sobě přiřazeny zcela odlišné nepříbuzné taxony. Systém byl velmi brzy kritizován. Již před rokem 1980 byly pochyby o orální ciliatuře jako hlavním znaku pro rozřazení nálevníků do skupin, na což Levine a kolektiv nebrali zřetel (Lynn 1976). Musel se tedy najít jiný přístup, který by více odpovídal fylogenezi kmene. Lynn (1976) vyslovil

hypotézu strukturního konzervatismu, která chápe somatickou ciliaturu jako zásadní pro zjišťování proběhlé evoluce nálevníků. Ultrastruktury somatické infraciliatury, jako jsou mikrotubulární struktury a další, kterými jsou propojeny kinetidy, jsou v evoluci lépe konzervované než orální (Lynn 1976). Ukázalo se, že orální struktury mají větší variabilitu. Jsou ovlivněny růstem buněk, reprodukcí i tím, čím se nálevníci živí (Lynn 1979). Systém na základě orálních struktur nemůže být tedy nadále uznáván (Small a Lynn 1981).

5. Systém na základě ultrastruktury somatické infraciliatury

Po zjištění, že somatické kinetidy jsou v evoluci více konzervované než orální, nastala rozsáhlá revize systému. Ta byla nově založena na struktuře somatických kinetid a ultrastrukturních datech získaných pomocí elektronové mikroskopie. Small a Lynn vytvořili systém tří podkmenů: Postciliodesmatophora, Rhabdophora a Cyrtophora (Small 1976; Small a Lynn 1981). Podkmen Postciliodesmatophora byl založen hlavně na základě stavby somatických struktur, ale další dva podkmeny byly založeny převážně na orálních strukturách (Lynn, 1996). Small a Lynn postupně vytvořili systém osmi tříd, které byly definovány především somatickými strukturami.

Zástupci podkmene Postciliodesmatophora mají postciliární mikrotubuly s postciliodesmaty vznikajícími ze somatických kinetid a mají i somatické dikinetidy (Gerassimova a Seravin 1976; Small a Lynn 1981). Do tohoto podkmene se řadily dvě třídy, Karyorelictea a Spirotrichea. Spirotrichea obsahovala řády Heterotrichia (dnes ve třídě Heterotrichia), Armophorida (dnes ve třídě Armophorea), Plagiotomida (dnes stále ve třídě Spirotrichea), Licnophorida (dnes stále ve třídě Spirotrichea), Clevelandellida (dnes ve třídě Armophorea) a Odontostomatida (dnes ve třídě Odontostomatea). Postciliární mikrotubuly mají i zástupci podkmene Cyrtophora, ale nevyskytují se u nich postciliodesmata (Lynn a Sogin 1988). Během jejich dělení dochází k dediferenciaci orálního ústrojí. To znamená, že během dělení nemůže nálevník přijímat potravu (Small a Lynn 1981). V tomto podkmenu se nacházely čtyři třídy, a to Phyllopharyngea, Nassophorea, Colpodea a Oligohymenophorea (všechny jsou dnes uznávány). Neexistují však žádné spolehlivé znaky, které by Postciliodesmatophora od Cyrtophora jasně odlišovaly. V podkmenu Rhabdophora mají nálevníci somatické monokinetidy a jejich orální aparát zůstává během dělení zachovaný (Small 1976). Do tohoto podkmene se řadily třídy Prostomatea a Litostomatea (i ty jsou uznávány dodnes).

6. Systém na základě molekulárních analýz

Na konci 80. let 20. století se začaly objevovat první molekulární analýzy a fylogenetické stromy. Byly založeny především na sekvencích genů pro SSU a LSU rRNA. Umožnilo to získat nový typ informací sloužící k rekonstrukci fylogeneze nálevníků. V roce 1988 se pomocí molekulárních sekvencí potvrdila existence všech osmi tříd, které byly založeny na somatických strukturách a nacházely se v systému Smalla a Lynna (Small a Lynn 1981). To také potvrdilo hypotézu, že znaky somatické ciliatury jsou v evoluci více konzervovány než znaky orálních struktur (Lynn & Sogin, 1988). Avšak složení třídy Spirotrichea se od dnešní podoby třídy značně lišilo. Molekulární studie navíc neprokázaly existenci tří podkmenů, ale pouze dvou.

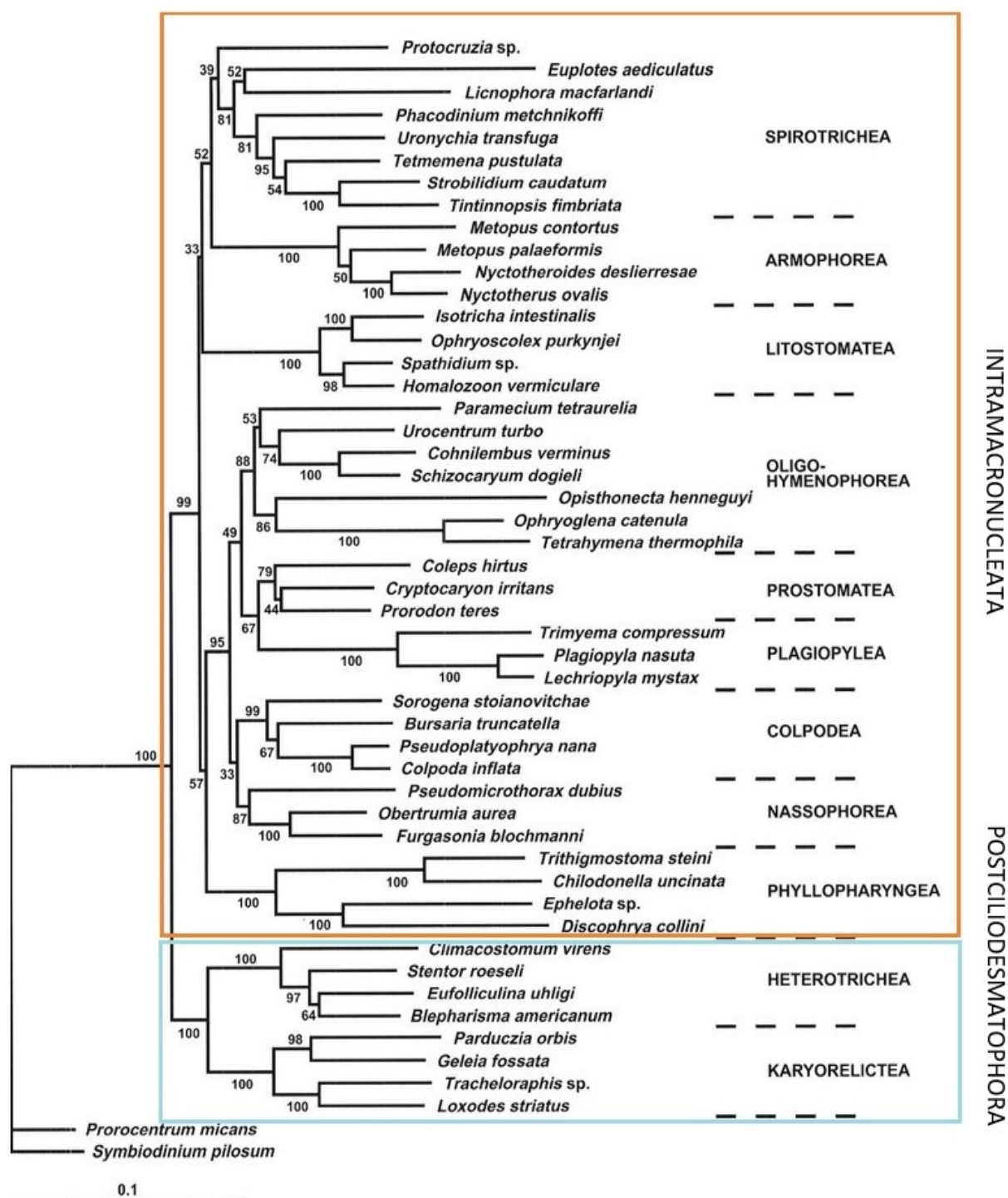
Podkmen Postciliodesmatophora zůstal zachován s několika změnami. Obsahuje třídu Karyorelictea a třídu Heterotrichea, která byla na třídu povýšena až na základě molekulárních studií (de Puytorac et al. 1993). Tyto dvě třídy k sobě byly přiřazeny na základě sekvencí genu pro SSU rRNA, jež byly získány ze zástupců těchto tříd (*Loxodes* – Karyorelictea; *Climacostornum*, *Eufolliculina* – Heterotrichea) (Hirt et al. 1995). Naopak z podkmene Postciliodesmatophora byla odstraněna třída Spirotrichea a také rod *Protocruzia* (Hammerschmidt et al. 1996). Zjistilo se, že sekvence genu pro SSU rRNA jsou mezi třídami Heterotrichea a Spirotrichea velmi rozdílné. Další odlišností těchto dvou tříd bylo, jakým způsobem se dělí jejich makronukleus (Hammerschmidt et al. 1996; Hirt et al. 1995). Na základě molekulárních analýz byla *Protocruzia* prozatímne umístěna do třídy Spirotrichea (Hammerschmidt et al. 1996).

Zástupci podkmene Postciliodesmatophora se vyznačují přítomností postciliodesmat na postciliárních mikrotubulech a charakteristickým vznikem makronukleu. Třída Karyorelictea má makronukleus, který se nedělí (Raikov 1982). U zástupců této třídy musí vznikat makronukleus diferenciací mikronukleu během každého buněčného dělení (Raikov 1985). U třídy Heterotrichea se makronukleus dělí pomocí extranukleárních mikrotubulů (Diener, Burchill, a Burton 1983). Všechny ostatní skupiny nálevníků mají makronukleus, který se dělí pomocí mikrotubulů umístěných uvnitř makronukleu (intramakronukleárních mikrotubulů) (Raikov 1982). Řadí se tedy do druhého, Lynnem definovaného podkmene Intramacronucleata (Lynn 1996). Tento podkmen byl založen až na základě fylogenetických stromů. Došlo zde k vyřazení řádů Armophorida a Clevelandellida ze třídy Spirotrichea. Později Lynn ustanovil třídu Armophorea, která zahrnuje tyto dva řády (Lynn 2003; Lynn a Small 1997). V tomto

podkmenu byla ustanovena další třída Plagiopylea. Její členové byli do té doby řazeni do třídy Oligohymenophorea na úrovni podtřídy (Lynn a Small 1997). Dále byl do třídy Plagiopylea přidán řád Odontostomatida, který byl v předešlých systémech nejdříve umístěn ve třídě Spirotrichea a následně ve třídě Armophorea (Jankowski 2007; Lynn 2008; Stoeck, Foissner, a Lynn 2007). Třídy Armophorea a Plagiopylea byly založeny pouze na základě analýz sekvencí genu pro SSU rRNA (Embley a Finlay 1994; van Hoek et al. 2000). Už v této době se vědělo, že i některé další skupiny budou vyžadovat status třídy (rod *Protocruzia*) (Lynn 1996).

6.1. Sjedení systémů

Během 90. let 20. století vzniklo mnoho odlišných klasifikací nálevníků. V době, kdy ve Spojených státech amerických Small a Lynn revidovali systém nálevníků na základě somatických a molekulárních struktur, vznikl i v Evropě nový systém de Puytoraca a jeho kolektivu (de Puytorac et al. 1993). I oni rozdělili nálevníky do tří podkmenů (Tubulicorticata, Filicorticata, Epiplasmata), ale do jiných, než vytvořili Small a Lynn. Využili v nich sekvence genu pro LSU rRNA i struktury kortexu nálevníků (Baroin-Tourancheau et al. 1992; de Puytorac et al. 1993). Tubulicorticata se vyznačovala mikrotubulárním kortexem, Filicorticata fibrilárním kortexem a Epiplasmata přítomností epiplazmy. V kmenu Ciliophora vytvořili jedenáct tříd, z nichž osm bylo rovnocenných s fylogenetickým systémem Smalla a Lynna (Lynn a Small 1997). Systém de Puytoraca a kolektivu obsahoval navíc třídy Hypotrichiea a Oligotrichiea, které v systému Smalla a Lynna tvoří pouze jednu třídu Spirotrichea. Dále de Puytorac uváděl třídu Vestibuliferea, jejíž zástupci se v systému Smalla a Lynna řadí do třídy Litostomatea. Naopak de Puytorac ve svém systému nezmiňuje třídu Prostomatea a zařazuje její zástupce do třídy Nassophorea. U tří skupin, které byly de Puytoracem povýšeny na třídu (Hypotrichiea, Oligotrichiea a Vestibuliferea) není na základě dalších molekulárních analýz žádná podpora, která by toto povýšení naznačovala (Lynn 2008). Systém de Puytoraca byl brzy zpochybněn. Znaky kortexu, kterými charakterizoval jednotlivé podkmeny, nebyly pro daný podkmen jedinečné, jelikož mohly být nalezeny téměř u všech nálevníků (Lynn a Small 1997). Prokázala se také existence pouze dvou podkmenů pomocí četných fylogenetických analýz na základě sekvence genu pro SSU i LSU rRNA (Hammerschmidt et al. 1996; Wright, Dehority, a Lynn 1997). Tři podkmeny vytvořené de Puytoracem nemůžeme tedy pokládat za monofyletické (Lynn 2003). Vědci se nakonec přiklonili k systému Smalla a Lynna, tedy k rozdělení nálevníků do dvou podkmenů (viz **Obr. 5**).

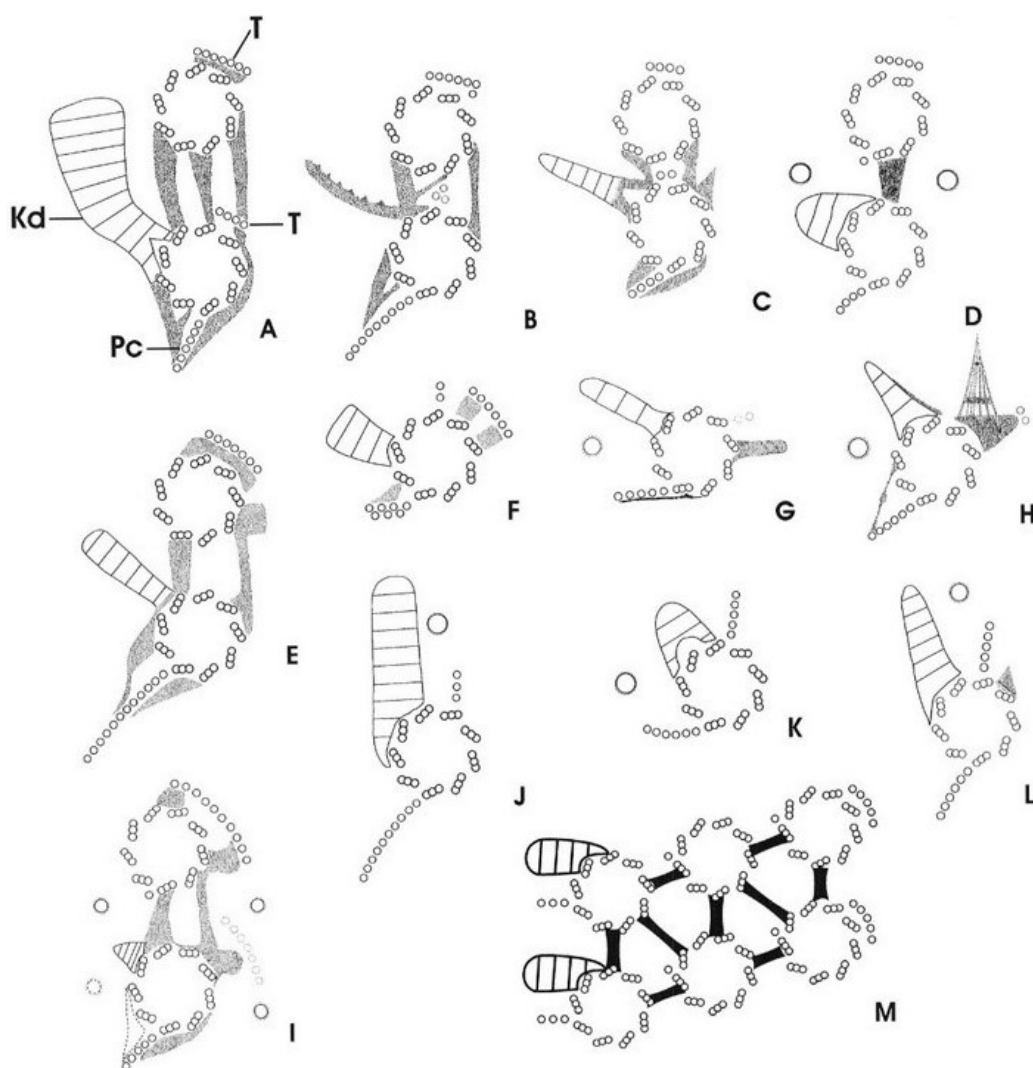


Obr. 5. Fylogenetický strom založený na genu pro SSU rRNA nálevníků. Jsou vyznačeny podkmeny Intramacronucleata – oranžové označení, Postciliodesmatophora – modré označení, a tehdy uznávané třídy. Upraveno z (Lynn 2003).

Muselo dojít k sjednocení a upřesnění systému nálevníků. Definovalo se, do jakých a kolika skupin jsou rozděleni, na základě čeho je můžeme poznat a jaké charakteristické znaky mají jednotlivé podkmeny, třídy a podtřídy. Za toto sjednocení můžeme považovat systém, jenž

vydal Lynn roku 2003 (Lynn 2003) a který je založen na morfologických (strukturách somatických kinetid) i molekulárních datech (viz **Obr. 6**) (Lynn 2003). Od té doby je univerzálně přijímáno, že kmen Ciliophora se dělí na dva podkmeny, Postciliodesmatophora a Intramacronucleata, což silně podporují fylogenetické analýzy genu pro SSU rRNA (viz **Obr. 5**), ale i multigenové analýzy (viz dále).

V podkmenu Postciliodesmatophora jsou dvě třídy, Karyorelictea a Heterotrichea. Dalších devět tříd se řadí do druhého podkmene Intramacronucleata, kde je nově zavedena třída Armophorea (Lynn 2003). Tento systém je s úpravami dodnes široce uznáván, i když došlo k vytvoření nových tříd a podtříd. Další změny můžeme očekávat například u rodu *Protocrusia*, kde stále neznáme přesnou polohu v podkmenu Intramacronucleata.



Obr. 6. Somatické kinetidy zástupců jednotlivých tříd v kmenu Nálevníci. Kinetodesmální fibrilly (Kd), postciliární mikrotubuly (Pc), transversální mikrotubuly (T). **A.** *Loxodes* – Třída Karyorelictea; **B.** *Blepharisma* – Třída Heterotrichea; **C.** *Protocrusia* – Třída Spirotrichea; **D.** *Euplotes* – Třída Spirotrichea; **E.** *Metopus* – Třída Armophorea; **F.** *Balantidium* – Třída Litostomatea; **G.** *Chilodonella* – Třída Phyllopharyngea; **H.** *Obertrumia* – Třída Nassophorea; **I.** *Colpoda* – Třída Colpodea; **J.** *Plagiopyla* – Třída Plagiopylea; **K.** *Holophrya* – Třída Prostomatea; **L.** *Tetrahymena* – Třída Oligohymenophorea; **M.** *Plagiotoma* – Třída Spirotrichea. Upraveno z (Lynn 2003).

6.2. Podkmen Postciliodesmatophora

Do podkmene Postciliodesmatophora patří dvě třídy, kterými jsou Karyorelictea a Heterotrichea. Níže jsou uvedeny vlastnosti, na základě kterých byly třídy definovány a jaké jsou jejich morfologické znaky.

6.2.1. Třída Karyorelictea

Třída Karyorelictea je podporována na základě morfologických znaků i fylogenetických sekvencí genu pro SSU rRNA (Lynn 2003). Zvláštností zástupců této třídy je nedělicí se makronukleus, který musí vznikat během každého dělení buňky z mikronukleu (Raikov 1982, 1985). Dalším charakteristickým znakem jsou somatické kinetidy v podobě postciliodesmat. Třída Karyorelictea se dále nedělí na podtřídy.

6.2.2. Třída Heterotrichea

Stejně jako předchozí třída, je i třída Heterotrichea silně podporována morfologickými znaky i molekulárními analýzami (Lynn 2003). Zástupci této třídy mají postciliodesmata a mohutně vyvinutou orální ciliaturu, kterou tvoří polykinetidy (de Puytorac et al. 1976). Jejich makronukleus se dělí pomocí extranukleárních mikrotubulů. Tato vlastnost se nevyskytuje u žádné jiné skupiny nálevníků (Diener et al. 1983). Ani tato třída se dále nedělí na podtřídy.

6.3. Podkmen Intramacronucleata

Tato kapitola se zabývá třídami z podkmenu Intramacronucleata, které jsou zahrnuty v široce uznávaném systému Lynna (Lynn 2003). Popisuje charakteristické morfologické struktury jednotlivých tříd, členění v třídách, data na základě kterých byly třídy definovány a jak třídy vypadají dnes.

6.3.1. Třída Litostomatea

Třída Litostomatea je podporována na základě struktur somatických kinetid i sekvencí genu pro SSU rRNA (Lynn 2003). Její zástupci mají somatické kinetidy v podobě monokinetid s dvěma transversálními mikrotubuly (Foissner a Foissner 1988; Small a Lynn 1981). Litostomatea

zahrnuje tři podtřídy, jimiž jsou Trichostomatia, Haptoria a Rhynchostomatia (Adl et al. 2012). Trichostomatia je považována za monofyletickou skupinu, Haptoria, ve které jsou nejasné vztahy, je považována za parafyletickou skupinu (Huang et al. 2018; Strüder-Kypke et al. 2006). V podtřídě Haptoria se nachází především volně žijící druhy, kdežto v podtřídě Trichostomatia jsou druhy endosymbiotické (Corliss 1974; Foissner a Foissner 1988). Zástupci podtřídy Trichostomatia mají kolem cytostomu hustou ciliaturu. Jejich orální kinetidy mohou být uspořádány do polykinetid (Vďačný et al. 2011). Hlavním morfologickým znakem pro Haptoria je přítomnost hřbetního kartáče (Huang et al. 2018; Lipscomb a Riordan 1990). Do třídy Litostomatea byla nedávno přidána třetí podtřída Rhynchostomatia, která je podporována molekulárními analýzami a představují ji rody *Dileptus*, *Rimaleptus* a další (Vďačný et al. 2011). Členové této podtřídy se do té doby nacházeli v podtřídě Haptoria a mají na rozdíl od podtřídy Rhynchostomatia zjednodušenou ústní ciliaturu (Foissner a Foissner 1988; Vďačný et al. 2011). Do této třídy bylo řazeno i *Mesodinium*. Dnes se mu na základě molekulárních analýz přisuzuje status třídy, a proto je mu věnována samostatná kapitola (viz níže).

6.3.2. Třída Phyllopharyngea

Třída Phyllopharyngea je podporována na základě morfologických i molekulárních dat (Lynn 2003). Zástupci této třídy mají rozmanitou podobu těla, ale všichni mají somatické kinetidy v podobě monokinetid (Small a Lynn 1981). Ze somatických monokinetid vychází subkinetální mikrotubuly nebo subkinetální kořeny („ribbons“). Kořen je fibrilární nebo mikrotubulární struktura, která se na konci rozšiřuje (Lynn 2008). V orální oblasti se u této třídy nachází cytofaryngeální koš. Ten je tvořen složitě uspořádanými mikrotubuly (Tucker 1968). Zástupci této třídy nemají alveolocysty (viz níže), čímž se liší od třídy Nassophorea. Ve třídě Phyllopharyngea byly rozpoznávány čtyři podtřídy: Cyrtophoria, Chonotrichia, Rhynchodia a Suctoria (Lynn 2008). V podtřídě Cyrtophoria byli umístěni volně žijící zástupci, ve zbylých podtřídách byly převážně symbiotické a parazitické druhy. Po získání dalších sekvencí genu pro SSU rRNA byly tyto čtyři podtřídy sjednoceny do jedné podtřídy s názvem Subkinetalia (Gong et al. 2009). Charakteristickým znakem této podtřídy jsou monokinetidy s subkinetálními kořeny (Adl et al. 2019; Gong et al. 2009). Další změnou v této třídě bylo vytvoření podtřídy Synhymenia (Adl et al. 2012; Gong et al. 2009; Pan et al. 2019), která se dříve řadila do třídy Nassophorea na úrovni řádu. Zástupci této podtřídy mají monokinetidy se subkinetálními mikrotubuly (Gong et al. 2009).

6.3.3. Třída Nassophorea

Třída Nassophorea byla definována na základě somatických kinetid, jež jsou ve formě monokinetid a dikinetid. Typickou strukturou pro tuto třídu je cytofaryngeální koš, stejně jako u třídy Phyllopharyngea. Pomocí něj Nassophorea nahánějí a získávají potravu (Tucker 1968, 1970). Potravou u třídy Nassophorea jsou vláknité řasy, které jsou do buňky soukány specifickým pohybem cytofaryngeálního koše (Tucker 1967). Charakteristickým znakem této třídy jsou alveolocysty, které se nacházejí v blízkosti bazálních tělísek (Eisler 1988; Eisler a Bardele 1983). Vznikají z alveolární membrány, která pronikne do epiplasmy a vytvoří membránový váček (Eisler a Bardele 1983). Alveolocysty jsou místem, kde se akumuluje vápník, a nejspíše slouží ke kontrole pohybu nálevníka (Eisler a Bardele 1983).

Provedením molekulárních analýz na základě sekvencí genu pro SSU rRNA se zjistilo, že třída není monofyletická. Fylogenomické studie ukázaly, že některé druhy třídy Nassophorea úzce souvisí se třídou Phyllopharyngea (Gong et al. 2009; Zhang et al. 2014). Příkladem je řád Synhymeniida, který je dnes řazen do třídy Phyllopharyngea na úrovni řádu (viz třída Phyllopharyngea).

6.3.4. Třída Colpodea

Další třída podporovaná molekulárními i morfologickými daty je Colpodea. Somatické kinetidy jsou uspořádány do dikinetid, které mají u této skupiny LKm vlákna. Tato vlákna jsou tvořena překrývajícími se transversálními mikrotubuly (Golder a Lynn 1980). Struktury orální ciliatury jsou v této třídě velmi rozmanité. Třída Colpodea se dále nedělí na podtřídy.

6.3.5. Třída Oligohymenophorea

Oligohymenophorea je nejrozmanitější třídou nálevníků a je dobře podporována molekulárními sekvencemi (Gao et al. 2016). Jejich společným znakem je přítomnost tří orálních polykinetid na levé straně cytostomu a parorální kinety (ciliární struktury) na pravé straně (Levine et al. 1980). Somatickými kinetidy jsou monokinetidy, jež se podobají monokinetidám jiných tříd. Mají transversální mikrotubuly a dobře vyvinuté kinetodesmální fibrily. Vyskytují se u nich i dikinetidy, které jsou většinou na přední polovině jejich těla (Small a Lynn 1981). Zástupci této třídy mají také orální polykinetidy. Na základě těchto struktur lze třídu oddělit od ostatních

(Lynn 2008). Třída Oligohymenophorea se skládá z šesti podtříd, kterými jsou Peniculia, Scuticociliatia, Hymenostomatia, Apostomatia, Peritrichia a Astomatia (Lynn 2003, 2008).

Oligohymenophorea byla zavedena již v systému Levina a kolektivu (1980), je to tedy skupina, která v systémech zůstala nejdéle. Třída Oligohymenophorea v Levinově systému obsahovala pouze dvě podtřídy, Hymenostomatia a Peritrichia. Podtřída Hymenostomatia zahrnovala dnešní podtřídy Astomatia, Peniculia a Scuticociliatia (Levine et al. 1980). Oproti dnešku se lišilo umístění podtřídy Apostomatia. Ta byla zařazena mimo třídu Oligohymenophorea do třídy Kinetofragminophorea na základě podobností kinetid.

6.3.6. Třída Spirotrichea

Jednou z největších tříd nálevníků je Spirotrichea, která je podporována pouze na základě morfologie (Lynn 2003). Zástupci této skupiny jsou velmi rozmanití. Tato skupina má charakteristické spirální uspořádání orálních kinetid kolem cytostomu. Tyto kinetidy jsou ve formě polykinetid (Small a Lynn 1981). Somatické kinetidy se u nich vyskytují nejčastěji v podobě dikinetid, ale objevují se i polykinetidy, které mají často podobu cirr (Gates 1977; Small a Lynn 1985). Kinetidy u této skupiny nemají dobře vyvinuté kinetodesmální fibrily. Společným znakem Spirotrichea je replikační pás, který vzniká na makronukleu během buněčného dělení a podílí se na replikaci DNA a syntéze histonů. Pás na makronukleu nemusí být pouze jeden. Příkladem je *Euplotes*, který má podlouhlý makronukleus a replikační pásy u něj putují od konců makronukleu ke středu (Lin a Prescott 1985).

Lynn ve své publikaci v roce 2003 rozdělil tuto třídu na základě molekulárních dat na sedm podtříd: Protocruziidia, Phacodiniidia, Hypotrichia, Oligotrichia, Choreotrichia, Stichotrichia a Licnophoria (Lynn 2003). Od té doby se na základě nových sekvencí, dat a fylogenomických studií systém třídy Spirotrichea změnil. Současný systém členění třídu Spirotrichea pouze na šest podtříd: Euplotia, Hypotrichia, Oligotrichia, Choreotrichia, Licnophorida a Kiitrichia (Adl et al. 2019). Členové třídy Euplotia a Kiitrichia v Lynnově systému patřili do podtřídy Hypotrichia. Byli vyřazeni na základě molekulárních analýz i morfologických znaků (Li et al. 2009). Naopak podtřída Stichotrichia byla zahrnuta do podtřídy Hypotrichia. Podtřídy Hypotrichia, Oligotrichia a Choreotrichia byly všechny zařazeny do skupiny Perilemmaphora (Berger 2008). Sjednocujícím znakem této skupiny je přítomnost perilemy, což je membrána, která pokrývá pelikulu (Berger 2008; Dong et al. 2020).

Problematickými podtřídami byly Protocruziidia a Phacodiniidia. Nevyskytuje se u nich replikační pás, který je charakteristický pro tuto třídu (Lynn 2008). Jelikož má *Protocruzia*

adorální polykinetidy byla zařazena do této třídy, přestože se její ultrastruktura výrazně liší od ultrastruktury charakteristické pro třídu Spirotrichea (Hammerschmidt et al. 1996). Obě tyto podtřídy jsou v současnosti ze třídy Spirotrichea vyřazeny. Podtřída Protocruziidia byla povýšena na třídu v podmenu Intramacronucleata (viz kapitola 6.4.1.). *Phacodinium* bylo umístěno do skupiny SAL (zkratka odvozená z názvů tříd: Spirotrichea, Armophorea, Litostomatea) s nejasnou pozicí v této skupině (Adl et al. 2019).

6.3.7. Třída Prostomatea

Třída Prostomatea je jednou z nejmenších tříd nálevníků a má nízkou druhovou rozmanitost (Lynn 2008). Somatická ciliatura je u této třídy nejčastěji v podobě monokinetid. Zástupci této skupiny jsou k sobě přiřazeni jen na základě podobností v orální ciliatuře (Hiller 1993). Není známo dostatek dat jak molekulárních, tak i ultrastrukturních, aby se tato třída mohla považovat za monofyletickou (Zhang et al. 2014). Na základě některých fylogenetických stromů se do této třídy řadí třída Plagiopylea (Huang et al. 2018). Zatím je nedostatek dat pro uznání tohoto sjednocení.

6.3.8. Třída Plagiopylea

Plagiopylea je třída založená pouze na sekvencích genu pro SSU rRNA (Embley a Finlay 1994; Lynn a Strüder-Kypke 2002). Na základě molekulárních sekvencí můžeme tuto třídu považovat za monofyletickou. Členové této třídy žijí pouze v anaerobním prostředí a nevyskytují se u nich žádné známé společné znaky (Lynn 2008). Mají somatické monokinetidy podobající se kinetidám tříd Oligohymenophorea a Prostomatea (Lynn 2008). Tato třída je ve skutečnosti možná součástí třídy Prostomatea (Huang et al. 2018). Problém v této třídě je druh *Epalxella*, který svou morfologií více odpovídá třídě Odontostomatea, protože má somatické dikinetidy a orální polykinetidy. Ale naopak z fylogenetických analýz, na základě sekvence genu pro SSU rRNA, vyplývá vztah tohoto rodu se třídou Plagiopylea (Adl et al. 2019; Stoeck et al. 2007).

6.3.9. Třída Armophorea

Třída Armophorea se označuje jako „riboclass“. Toto označení vychází z toho, že je založena pouze na základě molekulárních sekvencí genu pro SSU rRNA (Lynn 2003). Lynn se domníval, že molekulární data podporují monofylii třídy Armophorea, ale není tomu tak. V molekulárních

6.4. Nově vytvořené třídy nálevníků

PHYLLOPHARYNGEA

PROSTOMATEA

PLAGIOPYLEA

OLIGOHYMENOPHOREA

PROTOCRUZIEA

SPIROTRICHEA

CARIACOTRICHEA

KARYORELICTEA

HETEROTRICHEA

ARMOPHOREA

LITOSTOMATEA

COLPODEA

NASSOPHOREA

INTRAMACRONUCLEATA

POSTCILIODESMATOPHORA

MESODINIIDAE

PROTOCRUZIDA

EUPLOTIA

20

6.4.1. Třída Protocruzia

První novou třídou je třída Protocruzia (viz **Obr. 7**). Její zástupci se dříve řadili do třídy Heterotrichea a následně byli dočasně přesunuti do třídy Spirotrichea (Hammerschmidt et al. 1996). Poloha na fylogenetickém stromě na základě genů pro histony H3 a H4 byla pro tuto skupinu dvojznačná. Záviselo to na tom, jestli se použily sekvence DNA nebo proteinů (Bernhard a Schlegel 1998). Získáním sekvencí genu pro SSU rRNA se zjistilo, že Protocruzia je více příbuzná třídě Spirotrichea než třídě Heterotrichea (Hammerschmidt et al. 1996; Shin et al. 2000). Na základě dalších molekulárních analýz se prokázalo, že nepatří do třídy Spirotrichea. Třída Protocruzia by mohla mít hlubší postavení a tvořit hlubokou větev na fylogenetickém stromě nálevníků (Gentekaki et al. 2014; Jiang et al. 2017). Pomocí fylogenomických analýz u několika druhů *Protocruzia* se zjistilo, že nepatří do žádné existující třídy nálevníků a měly by tedy tvořit samostatnou skupinu (Jiang et al. 2017).

Vyřazení podtřídy Protocruziidia ze třídy Spirotrichea je podpořeno i morfologickými znaky. Protocruziidia nemají replikační pás, jenž je typickým znakem třídy Spirotrichea (Ruthmann a Hauser 1974). Liší se také zvláštním dělením makronukleu, což by mohlo způsobovat komplikace při zjišťování polohy této skupiny (Lynn 2008). Jeho dělení připomíná mitózu, což není známo u žádného jiného zástupce v kmenu Ciliophora (Ruthmann a Hauser 1974).

6.4.2. Třída Mesodiniea

Nejasné postavení má rod *Mesodinium*, pro který se také navrhuje status třídy (Chen et al. 2015). Rod *Mesodinium* byl nejčastěji řazen do třídy Litostomatea, podtřídy Haptorida a řádu Cyclotrichida (Adl et al. 2012; Lynn 2008). Nalezly se tři společné molekulární znaky se členy třídy Litostomatea (Johnson et al. 2004). V genu pro SSU rRNA se však u těchto nálevníků vyskytují časté delece a inserce, což může znesnadnit určení jejich pozice na fylogenetickém stromě (Johnson et al. 2004). Stavba jejich somatické ciliatury je nezvyklá a velmi se liší od somatické ciliatury, která je charakteristická pro třídu Litostomatea (Lynn 1991). *Mesodinium* má dva typy somatické ciliatury, dikinetidy, a polykinetidy, které tvoří cirri (Nam et al. 2015).

Z řady studií založených na sekvencích genu pro SSU rRNA a fylogenomických analýz vyplývá, že je *Mesodinium* hluboká bazální linie v podkmenu Intramacronucleata a měla by tedy tvořit vlastní třídu v tomto podkmenu (Chen et al. 2015; Strüder-Kypke et al. 2006). Druhou variantou je, že by skupina měla fylogenetickou polohu na bázi mezi podkmeny

nálevníků (viz **Obr. 7**) (Gao et al. 2016; Johnson et al. 2004). Nejnovější studie jsou v rozporu s umístěním třídy Mesodiniea jako bazální ke všem nálevníkům. Podle nich má Mesodiniea blízký vztah se třídou Litostomatea, kam bylo *Mesodinium* mnoho let řazeno (Bass et al. 2009; Johnson et al. 2004). V předchozích studiích mohlo dojít ke kontaminaci vzorků *Mesodinium* potravou, kterou jsou skrytěnky (Lasek-Nesselquist a Johnson 2019). Dnes je *Mesodinium* prozatím umístěno v podkmenu Intramacronucleata ve skupině SAL s nejasnou přesnější polohou (Adl et al. 2019).

6.4.3. Třída Cariacotrichea

V podkmenu Intramacronucleata byla vytvořena další nová třída, která obsahuje nálevníky žijící v anaerobním prostředí. Touto skupinou je třída Cariacotrichea zastoupená pouze jedním nekultivovaným druhem (viz **Obr. 7**) (Orsi et al. 2012). Je založena na základě sekvencí genu pro SSU rRNA (Stoeck, Taylor, a Epstein 2003). Nejbližší fylogenetický vztah má tato skupina pravděpodobně se třídou Spirotrichea (Campello-Nunes et al. 2020).

6.4.4. Třída Odontostomatea

Další nově zavedenou skupinou v podkmenu Intramacronucleata je třída Odontostomatea, která zahrnuje pouze anaerobní zástupce (Fernandes et al. 2018). Členové této třídy dříve tvořili řád ve třídě Plagiopylea, kam byli zařazeni na základě sekvencí genu pro 18S-rDNA (Stoeck et al. 2007). Jejich morfologické struktury se však lišily od zástupců třídy Plagiopylea. Odontostomatea se vyznačují tlustou epiplazmou, mají velmi redukované alveoly nebo nemají žádné. Dále mají somatické dikinetidy, kdežto u třídy Plagiopylea se nejčastěji vyskytují somatické monokinetidy (Schrenk a Bardale 1991). Založení této třídy tedy podporují jak sekvence genů pro SSU a LSU rRNA, tak i znaky somatické infraciliatury (Fernandes et al. 2018).

6.4.5. Třída Muranotrichea

Třída Muranotrichea, stejně tak jako předchozí třída, obsahuje pouze anaerobní zástupce. Je to nová linie nálevníků na úrovni třídy v podkmenu Intramacronucleata. Třída byla vytvořena hlavně na základě fylogenomických analýz 124 genů. Vytvoření této třídy podpořily i fylogenetické analýzy sekvencí genu pro 18S rRNA a 28S rRNA. Jejich somatická ciliatura je

tvořena dikinetidami. Na povrchu buňky mají ektosymbionty, ale obsahují i endosymbionty v cytoplazmě (Rotterová et al. 2020).

6.4.6. Třída *Parablepharisma*

Poslední definovanou skupinou v podmenu *Intramacronucleata* je třída *Parablepharisma* (Rotterová et al. 2020). Tato třída byla stanovena hlavně na základě fylogenomických analýz 124 genů a také fylogenetických analýz sekvencí genu pro SSU a LSU rRNA. Zástupci této třídy byli na základě morfologie doposud řazeni do třídy *Heterotrichea* v podmenu *Postciliodesmatophora*, ale fylogenomické analýzy příslušnost k této třídě nepotvrdily (Campello-Nunes et al. 2020; Rotterová et al. 2020). Ukázalo se, že nemají postciliodesmata jako zástupci třídy *Heterotrichea*, ale pouze překrývající se postciliární mikrotubuly. Jejich jádro se také nedělí pomocí extranukleárních mikrotubulů, což je charakteristické pro třídu *Heterotrichea* (Campello-Nunes et al. 2020). Zástupci této třídy mají ektosymbiotické bakterie, které jsou uchyceny na kortexu a endosymbionty, kteří jim pomáhají s životem v anaerobním prostředí (Fenchel, Perry, a Thane 1977; Modeo et al. 2013).

6.5. Fylogenetické vztahy mezi třídami nálevníků

Fylogenomické studie umožňují zjistit bližší vztahy mezi jednotlivými skupinami v kmenu *Ciliophora*. Tyto analýzy jsou založeny na stovkách genů a poskytují přesnější informace o hlubokých příbuznostech než fylogenetické analýzy. Ty byly u nálevníků založeny především na analýzách genu 18S rRNA nebo na morfologii (Gentekaki et al. 2014).

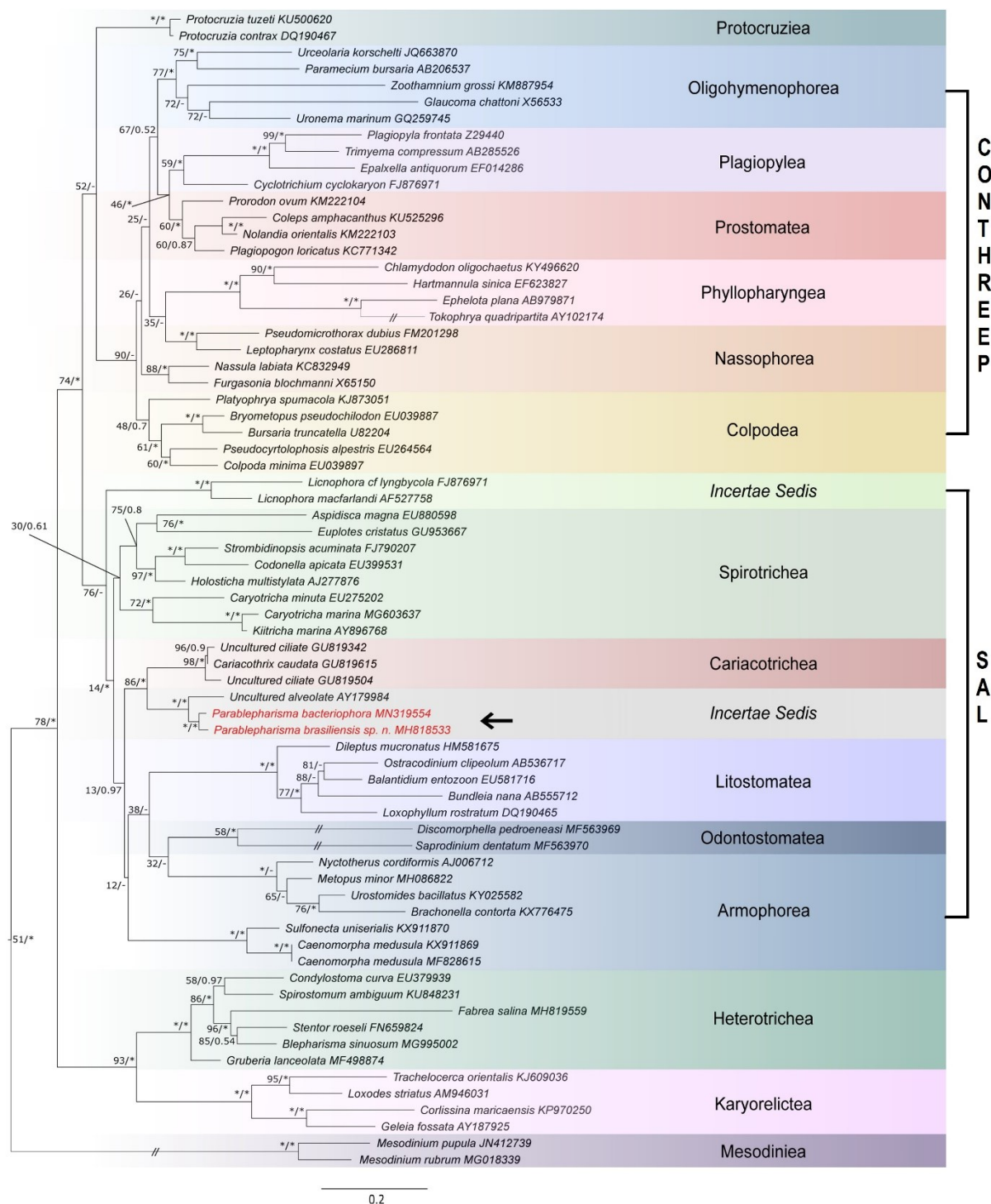
Fylogenetické vztahy v kmenu *Ciliophora* jsou stále nejisté. U některých skupin je stále nedostatek dat na to, aby výsledky těchto analýz byly vypovídající. Jednou z prvních zjištěných příbuzností je sesterský vztah tříd *Heterotrichea* a *Karyorelictea* (Greenwood et al. 1991). Ten byl zjištěn pomocí sekvencí genů pro rRNA i multigenových analýz (Fernandes et al. 2016; Gao a Katz 2014; Hirt et al. 1995). Tyto dvě třídy mají společné i morfologické znaky. Význačná je především přítomnost postciliodesmat.

Vztahy mezi třídami v podmenu *Intramacronucleata* nejsou zcela objasněny a zatím pro ně existuje jen málo fylogenomických studií. Na základě nich byly už v tomto podmenu vytvořeny dvě skupiny tříd (viz **Obr. 8**). První skupinou je SAL, do které se řadí třídy: *Spirotrichea*, *Armophorea*, *Litostomatea*, *Odontostomatea*, *Muranotrichea* a *Parablepharisma* (Gentekaki et al. 2014, 2017; Denis H Lynn a Kolisko 2017; Lynn, Kolisko, a Bourland 2018;

Rotterová et al. 2020). Ve druhé skupině, označované jako CONthreeP, se nachází třídy: Colpodea, Oligohymenophorea, Nassophorea, Prostomatea, Plagiopylea a Phyllopharyngea (Adl et al. 2012; Lynn 2008).

V rámci skupiny SAL byla překvapivá fylogenetická příbuznost tříd Armophorea a Litostomatea, protože tyto dvě třídy se zdají být velmi rozdílné. Liší se morfologií somatických i orálních kinetid. Armophorea mají somatické dikinetidy a dobře vyvinutou orální ciliaturu, kdežto Litostomatea mají somatické monokinetidy a orální ciliatura je velmi jednoduchá. Obě tyto třídy mají dobře vyvinuté postciliární mikrotubuly s charakteristickým uspořádáním v kortexu. Uskupení těchto dvou tříd bylo označeno jako Lamellicorticata, což se ukázalo na fylogenetických stromech (Vďačný, Orsi, a Foissner 2010). Fylogenomické analýzy ale toto uskupení nepotvrdily (Gao a Katz 2014; Gentekaki et al. 2017; Denis H. Lynn a Kolisko 2017). Na základě nich se ukázalo, že by třída Armophorea mohla mít sesterský vztah s třídou Spirotrichea (Fernandes a Schrago 2019). Do skupiny SAL byly na základě fylogenomických analýz genu 18S rRNA a 28S rDNA přiřazeny další tři třídy, a to Odontostomatea, Muranotrichea a Parablepharisma (Fernandes et al. 2018; Orsi et al. 2012; Rotterová et al. 2020). Seskupení tří anaerobních tříd v rámci této skupiny bylo označeno jako AMP (Armophorea, Muranotrichea a Parablepharisma). Sesterský vztah k této skupině má třída Spirotrichea, což je podpořeno na základě 124 genové fylogenomické analýzy (Rotterová et al. 2020).

Skupina CONthreeP se podobá uspořádání bývalého podkmene Cyrtophora (Small 1976), je podporována 18S rRNA sekvencemi a nemá žádné společné morfologické znaky (Gentekaki et al. 2014). Na základě fylogenetických analýz se předpokládá, že předek této skupiny měl cytofaryngeální koš (Lynn et al. 2018). U tříd Oligohymenophorea a Colpodea je tento koš velmi zjednodušený. Naopak u třídy Nassophorea zůstává velmi složitý (Tucker 1968). Fylogenetickou příbuznost v CONthreeP mají třídy Prostomatea a Plagiopylea. Tato skupina je označena jako PP. Oligohymenophorea má s touto skupinou sesterský vztah (Gao et al. 2016). Blízkou polohu na fylogenetickém stromě mají také třídy Oligohymenophorea a Colpodea (Lynn et al. 2018). Další fylogenetické analýzy ukazují, že třída Phyllopharyngea je příbuzná třídě Nassophorea. Tomu napovídají i podobné morfologické znaky těchto dvou skupin (Gong et al. 2009).



Obr. 8. Fylogenetický strom nálevníků založený na sekvencích genu pro 18S rDNA, kde jsou v podkmenu Intramacronucleata zobrazeny dvě skupiny CONthreeP a SAL. Upraveno z (Campello-Nunes et al. 2020).

7. Závěr

Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o vývoji systematiky nálevníků v období posledních čtyřiceti let. Největší změny nastávaly ve vyšší systematice, kterou se tato práce zabývá. Systém na nižší úrovni zůstal ve většině případů zachován.

Dnes se již nepochybuje o rozdělení nálevníků do dvou podkmenů. Tento fakt byl přijat a potvrzen řadou molekulárních analýz i na základě morfologických znaků. Stejně tak se nepochybuje o vztazích a členění v podkmenu Postciliodesmatophora. Naopak počet tříd v podkmenu Intramacronucleata je stále diskutabilní. V rámci tohoto podkmene je problém se třídou Plagiopylea, která by mohla patřit do třídy Prostomatea. Tomuto sjednocení napovídá i podobnost jejich somatických kinetid. Další třídou, u které můžeme očekávat změny, je třída Nassophorea, protože není monofyletická. Stejně tak změny očekáváme u *Phacodinium* a *Mesodinium*, které jsou zařazeny do skupiny SAL s nejasným bližším umístěním. U třídy Protocruzia také neznáme polohu na fylogenetickém stromě, víme jen to, že patří do podkmene Intramacronucleata. Také je potřeba objasnit vztahy tříd v rámci skupiny SAL. Budou nutné další molekulární analýzy a získání sekvencí z více druhů nálevníků, aby se objasnily dosavadní nedostatky a upevnily fylogenomické polohy skupin nálevníků.

Molekulární analýzy byly prováděny převážně na základě sekvencí genů pro rRNA, o kterých se v dnešní době pochybuje, zda dobře představují fylogenezi (Feng et al. 2015; Gentekaki et al. 2014). Bylo by dobré provést více analýz založených na více genech. Ale vzhledem k rozmanitosti genových sekvencí a velkému počtu druhů v rámci podkmene, je možné, že nám některé vztahy mezi nálevníky zůstanou utajeny.

8. Přehled literatury

- Adl, S.M., Bass, D., Lane, C.E., Lukeš, J., Schoch, C.L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M.W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A.A., Hoppenrath, M., James, T.Y., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D.J.G., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., Mann, D.G., Massana, R., Mitchell E.A.D., Morrow, C., Park, J.S., Pawlowski, J.W., Powell, M.J., Richter, D.J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F.W., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky, V., Zhang, Q. 2019. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 66: 4–119.
- Adl, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G.B., Archibald, J.M., Anderson, O.R., Bass, D., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Farmer, M.A., Karpov, S., Kolisko, M., Lane, C.E., Lodge, D.J., Mann, D.G., Meisterfeld, R., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S.E., Smirnov, A.V., Spiegel F. 2007. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic Biology* 56: 684–689.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L.L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W.. 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59: 429–493.
- Allen, R.D. 1971. Fine structure of membranous and microfibrillar systems in the cortex of *Paramecium caudatum*. *Journal of Cell Biology* 49: 1–20.
- Allen, S., Gibson, I. 1972. Genome amplification and gene expression in the ciliate macronucleus. *Biochemical Genetics* 6: 293–313.
- Allen, S.L. 1967. Genomic exclusion: A rapid means for inducing homozygous diploid lines in *Tetrahymena pyriformis*, Syngen I. *Science* 155: 575–578.
- Baroin-Tourancheau, A., Delgado, P., Perasso, R., Adoutte, A. 1992. A broad molecular phylogeny of ciliates: Identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 9764–9768.
- Baroin, A., Perasso, R., Qu, L.H., Brugerolle, G., Bachellerie, J.P., Adoutte, A. 1988. Partial phylogeny of the unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S ribosomal RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 3474–3478.
- Bass, D., Brown, N., MacKenzie-Dodds, J., Dyal, P., Nierzwicki-Bauer, S.A., Vepritskiy, A.A., Richards, T.A. 2009. A molecular perspective on ecological differentiation and biogeography of cyclotrichiid ciliates. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56: 559–567.
- Bennett, R.M., Honda, D., Beakes, G.W., Thines, M., Archibald, J.M., Simpson, A.G.B., Slamovits, C.H., Margulis, L., Melkonian, M., Chapman, D.J. 2017. Handbook of the Protists. In: Archibald, J.M., Simpson, A.G.B., Slamovits, C.H., Margulis, L., Melkonian, M., Chapman, D.J., Corliss, J.O. (eds). Springer International Publishing, pp 1–36.
- Berger, H. 2008. Monograph of the Amphisiellidae and Trachelostylidae (Ciliophora,

- Hypotricha). *Monographie Biol.* 88: 1–737.
- Bernhard, D., Schlegel, M. 1998. Evolution of histone H4 and H3 genes in different ciliate lineages. *Journal of Molecular Evolution* 46: 344–354.
- Bohatier, J. 1970. Structure et ultrastructure de *Lacrymaria olor* (O. F. M. 1786). *Protistologica* 6: 331–342.
- van Bruggen, J.J.A., Stumm, C.K., Vogels, G.D. 1983. Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa. *Archives of Microbiology* 136: 89–95.
- Burki, F., Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M., Skjæveland, Å., Nikolaev, S.I., Jakobsen, K.S., Pawlowski, J. 2007. Phylogenomics reshuffles the eukaryotic supergroups. *PLoS ONE* 2: e790.
- Campello-Nunes, P.H., Fernandes, N.M., Szokoli, F., Fokin, S.I., Serra, V., Modeo, L., Petroni, G., Soares, C.A.G., da S. Paiva, T., da Silva-Neto, I.D. 2020. *Parablepharisma* (Ciliophora) is not a heterotrich: A phylogenetic and morphological study with the proposal of new taxa. *Protist* 171: 125716.
- Chen, X., Ma, H., Al-Rasheid, K.A.S., Miao, M. 2015. Molecular data suggests the ciliate *Mesodinium* (Protista: Ciliophora) might represent an undescribed taxon at class level. *Zoological Systematics* 40: 31–40.
- Corliss, J.O. 1974. Remarks on the composition of the large ciliate class Kinetofragmophora de Puytorac et al., 1974, and recognition of several new taxa therein, with emphasis on the primitive order Primociliatida n. ord. *The Journal of Protozoology* 21: 207–220.
- Corliss, J.O. 1974. The changing world of ciliate systematics: Historical analysis of past efforts and a newly proposed phylogenetic scheme of classification for the protistan phylum Ciliophora. *Systematic Zoology* 23: 91–138.
- Corliss, J.O. 1979. The impact of electron microscopy on ciliate systematics. *American Zoologist* 19: 573–587.
- Corliss, J.O. 1998. Biodiversity of the cilioprotists and the contributions of Faure-Fremiet to the field. *Protist* 149: 277–290.
- Corliss, J.O. 2004. Why the world needs protists! *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51: 8–22.
- Damaj, R., Pomel, S., Bricheux, G., Coffe, G., Viguès, B., Ravet, V., Bouchard, P. 2009. Cross-study analysis of genomic data defines the ciliate multigenic epiplasmin family: strategies for functional analysis in *Paramecium tetraurelia*. *BMC Evolutionary Biology* 9: 125.
- Diener, D.R., Burchill, B.R., Burton, P.R. 1983. Microtubules and filaments beneath the fission furrow of *Stentor coeruleus*. *The Journal of Protozoology* 30: 83–90.
- Dong, J., Li, L., Fan, X., Ma, H., Warren, A. 2020. Two *Urosoma* species (Ciliophora, Hypotrichia): A multidisciplinary approach provides new insights into their ultrastructure and systematics. *European Journal of Protistology* 72: 125661.
- Eisler, K., Bardele, C.F. 1983. The alveolocysts of the Nassulida: ultrastructure and some phylogenetic considerations. *Protistologica* 19: 95–102.
- Eisler, K. 1988. Electron microscopical observations on the ciliate *Furgasonia blochmanni* Fauré-Fremiet, 1967. Part I: An update on morphology. *European Journal of Protistology*

- Embley, T., Finlay, B. 1994. The use of small subunit rRNA sequences to unravel the relationships between anaerobic ciliates and their methanogen endosymbionts. *Microbiology* 140: 225–235.
- Fenchel, T., Perry, T., Thane, A. 1977. Anaerobiosis and symbiosis with bacteria in free-living ciliates. *The Journal of Protozoology* 24: 154–163.
- Feng, J.M., Jiang, C.Q., Warren, A., Tian, M., Cheng, J., Liu, G.L., Xiong, J., Miao, W. 2015. Phylogenomic analyses reveal subclass Scuticociliatia as the sister group of subclass Hymenostomatia within class Oligohymenophorea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 90 :104–111.
- Fernandes, N.M., da S. Paiva, T., da Silva-Neto, I.D., Schlegel, M., Schrago, C.G. 2016. Expanded phylogenetic analyses of the class Heterotrichea (Ciliophora, Postciliodesmatophora) using five molecular markers and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 95: 229–246.
- Fernandes, N.M., Vizzoni, V.F., do N. Borges, B., Soares, C.A.G., da Silva-Neto, I.D., da S. Paiva, T. 2018. Molecular phylogeny and comparative morphology indicate that odontostomatids (Alveolata, Ciliophora) form a distinct class-level taxon related to Armophorea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 126: 382–389.
- Fernandes, N.M., Schrago, C.G. 2019. A multigene timescale and diversification dynamics of Ciliophora evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 139: 106521.
- Fernandez-Galiano, D. 1976. Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. *Transactions of the American Microscopical Society* 95: 557–560.
- Foissner, W., Foissner, I. 1988. The fine structure of *Fuscheria terricola* Berger et al., 1983 and a proposed new classification of the subclass Haptoria Corliss, 1974. *Archiv für Protistenkunde* 135: 213–235.
- Frankel, J., Heckmann, K. 1968. A simplified Chatton-Lwoff silver impregnation procedure for use in experimental studies with ciliates. *Transactions of the American Microscopical Society* 87: 317–321.
- Gao, F., Katz, L.A. 2014. Phylogenomic analyses support the bifurcation of ciliates into two major clades that differ in properties of nuclear division. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 70: 240–243.
- Gao, F., Warren, A., Zhang, Q., Gong, J., Miao, M., Sun, P., Xu, D., Huang, J., Yi, Z., Song, W. 2016. The all-data-based evolutionary hypothesis of ciliated protists with a revised classification of the phylum Ciliophora (Eukaryota, Alveolata). *Scientific Reports* 6: 24874.
- Gates, M.A. 1977. Analysis of positional information applied to cirral patterns of the ciliate *Euplotes*. *Nature* 268: 362–364.
- Gentekaki, E., Kolisko, M., Boscaro, V., Bright, K.J., Dini, F., Di Giuseppe, G., Gong, Y., Miceli, C., Modeo, L., Molestina, R.E., Petroni, G., Pucciarelli, S., Roger, A.J., Strom, S. L., Lynn, D.H. 2014. Large-scale phylogenomic analysis reveals the phylogenetic position of the problematic taxon *Protocruzia* and unravels the deep phylogenetic affinities of the ciliate lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 78: 36–42.

- Gentekaki, E., Kolisko, M., Gong, Y., Lynn, D. 2017. Phylogenomics solves a long-standing evolutionary puzzle in the ciliate world: The subclass Peritrichia is monophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 106: 1–5.
- Gerassimova, Z.P., Seravin, L.N. 1976. Ectoplasmic fibrillar system of Infusoria and its role for the understanding of their phylogeny. *Zool. Zh* 55: 645–656. [in Russian with English summary]
- Golder, T.K., Lynn, D.H. 1980. *Woodruffia Metabolica*: The systematic implications of its somatic and oral ultrastructures. *The Journal of Protozoology* 27: 160–169.
- Gong, J., Stoeck, T., Yi, Z., Miao, M., Zhang, Q., Mc L. Roberts, D., Warren, A., Song, W. 2009. Small subunit rRNA phylogenies show that the class Nassophorea is not monophyletic (phylum Ciliophora). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56: 339–347.
- Greenwood, S.J., Schlegel, M., Sogin, M.L., Lynn, D.H. 1991. Phylogenetic relationships of *Blepharisma americanum* and *Colpoda inflata* within the phylum Ciliophora inferred from complete small subunit rRNA gene sequences. *The Journal of protozoology* 38: 1–6.
- Hammerschmidt, B., Schlegel, M., Lynn, D.H., Leipe, D.D., Sogin, M.L., Raikov, I.B. 1996. Insights into the evolution of nuclear dualism in the ciliates revealed by phylogenetic analysis of rRNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43: 225–230.
- Hiller, S.A. 1993. Ultrastructure of *Prorodon* (Ciliophora, Prostomatida). I. Somatic cortex and some implications concerning kinetid evolution in prostomatid and colpodid ciliates. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40: 467–486.
- Hirt, R.P., Dyal, P.L., Wilkinson, M., Finlay, B.J., Roberts, D.M., Embley, T.M. 1995. Phylogenetic relationships among karyorelictids and heterotrichs inferred from small subunit rRNA sequences: Resolution at the base of the ciliate tree. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 77–87.
- van Hoek, A.H.A.M., Hackstein, J.H.P., van Alen, T.A., Sprakel, V.S.I., Leunissen, J.A.M., Brigge, T., Vogels, G.D. 2000. Multiple acquisition of methanogenic archaeal symbionts by anaerobic ciliates. *Molecular Biology and Evolution* 17: 251–258.
- Huang, J.B., Zhang, T., Zhang, Q., Li, Y., Warren, A., Pan, H., Yan, Y. 2018. Further insights into the highly derived haptorids (Ciliophora, Litostomatea): Phylogeny based on multigene data. *Zoologica Scripta* 47: 231–242.
- Huang, J., Luo, X., Bourland, W.A., Gao, F., Gao, S. 2016. Multigene-based phylogeny of the ciliate families Amphiseliidae and Trachelostylidae (Protozoa : Ciliophora : Hypotrichia). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 101: 101–110.
- Israel, R.L., Pond, S.L.K., Muse, S.V., Katz, L.A. 2002. Evolution of duplicated alpha-tubulin genes in ciliates. *Evolution* 56: 1110–1122.
- Jankowski, A.W. 2007. Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In: Alimov, A. F. (eds), Protista. Part 2, Handbook on Zoology. St. Petersburg: Russian Academy of Sciences, Zoological Institute, pp. 415–993.
- Janouskovec, J., Gavelis, G.S., Burki, F., Dinh, D., Bachvaroff, T.R., Gornik, S.G., Bright, K.J., Imanian, B., Strom, S.L., Delwiche, C.F., Waller, R.F., Fensome, R.A., Leander, B.S., Rohwer, F.L., Saldarriaga, J.F. 2017. Major transitions in dinoflagellate evolution unveiled by phylotranscriptomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: E171–E180.

- Jiang, J., Huang, J., Al-Farraj, S.A., Lin, X., Hu, X. 2017. Morphology and molecular phylogeny of two poorly known species of *Protocruzia* (Ciliophora: Protocruziida). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 64: 144–152.
- Johnson, M.D., Tengs, T., Oldach, D.W., Delwiche, C.F., Stoecker, D.K. 2004. Highly divergent SSU rRNA genes found in the marine ciliates *Myrionecta rubra* and *Mesodinium pulex*. *Protist* 155: 347–359.
- Lasek-Nesselquist, E., Johnson, M.D. 2019. A phylogenomic approach to clarifying the relationship of *Mesodinium* within the Ciliophora: A case study in the complexity of mixed-species transcriptome analyses. *Genome biology and evolution* 11: 3218–3232.
- Lemloh, M.L., Marin, F., Herbst, F., Plasseraud, L., Schweikert, M., Baier, J., Bill, J., Brümmer, F. 2013. Genesis of amorphous calcium carbonate containing alveolar plates in the ciliate *Coleps hirtus* (Ciliophora, Prostomatea). *Journal of Structural Biology* 181: 155–161.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, III.J., Lynn, D.H., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F.G. 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *The Journal of Protozoology* 27: 37–58.
- Li, C.W., Chen, J.Y., Lipps, J.H., Gao, F., Chi, H.M., Wu, H.J. 2007. Ciliated protozoans from the precambrian doushantuo formation, Wengan, South China. *Geological Society, London, Special Publications* 286: 151–156.
- Li, L., Shao, C., Song, W., Lynn, D.H., Chen, Z., Shin, M.K. 2009. Does *Kiitricha* (Protista, Ciliophora, Spirotrichea) belong to Euplotida or represent a primordial spirotrichous taxon? With suggestion to establish a new subclass Protohypotrichia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 439–446.
- Li, S., Bourland, W.A., Al-Farraj, S.A., Li, L., Hu, X. 2017. Description of two species of caenomorphid ciliates (Ciliophora, Armophorea): Morphology and molecular phylogeny. *European Journal of Protistology* 61: 29–40.
- Lin, M., Prescott, D.M. 1985. Electron microscope autoradiography of DNA synthesis in the replication band of two hypotrichous ciliates. *The Journal of protozoology* 32: 144–149.
- Lipscomb, D.L., Riordan, G.P. 1990. The ultrastructure of *Chaenea teres* and an analysis of the phylogeny of the haptorid ciliates. *The Journal of protozoology* 37: 287–300.
- Lynn, D. H. 1991. The implications of recent descriptions of kinetid structure to the systematics of the ciliated protists. *Protoplasma* 164: 123–142.
- Lynn, D.H., Small, E.B. 1990. Phylum Ciliophora. In: Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M., Chapman D.J. (eds). *Handbook of Protoctista*. Jones and Bartlett, Boston, pp. 498–523.
- Lynn, D.H. 1976. Comparative ultrastructure and systematics of the Colpodida. Structural conservatism hypothesis and a description of *Colpoda steinii* Maupas. *The Journal of Protozoology* 23: 302–314.
- Lynn, D.H. 1979. Fine structural specializations and evolution of carnivory in *Bresslaua* (Ciliophora: Colpodida). *Transactions of the American Microscopical Society* 98: 353–368.
- Lynn, D.H. 1981. The organization and evolution of microtubular organelles in ciliated

- protozoa. *Biological Reviews* 56: 243–292.
- Lynn, D.H. 1996. My journey in ciliate systematics. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43: 253–260.
- Lynn, D.H. 2003. Morphology or molecules: How do we identify the major lineages of ciliates (Phylum Ciliophora)? *European Journal of Protistology* 39: 356–364.
- Lynn, D.H. 2008. *The ciliated protozoa: characterization, classification, and guide to the literature* (3rd ed.). Springer Verlag, Dordrecht pp. 1–605.
- Lynn, D.H., Kolisko, M. 2017. Molecules illuminate morphology : phylogenomics confirms convergent evolution among ‘oligotrichous’ ciliates. 67: 3676–3682.
- Lynn, D.H., Kolisko, M., Bourland, W. 2018. Phylogenomic analysis of *Nassula variabilis* n. sp., *Furgasonia blochmanni*, and *Pseudomicrothorax dubius* confirms a nassophorean clade. *Protist* 169: 180–189.
- Lynn, D.H., Small, E.B. 1997. A revised classification of the phylum Ciliophora Doflein, 1901. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat* 47: 65–78.
- Lynn, D.H., Sogin, M.L. 1988. Assessment of phylogenetic relationships among ciliated protists using partial ribosomal RNA sequences derived from reverse transcripts. *BioSystems* 21: 249–254.
- Lynn, D.H., Strüder-Kypke, M. 2002. Phylogenetic position of *Licnophora*, *Lechriopyla*, and *Schizocaryum*, three unusual ciliates (Phylum Ciliophora) endosymbiotic in echinoderms (Phylum Echinodermata). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 460–468.
- Lynn, D.H., Wright, A.D.G. 2013. Biodiversity and molecular phylogeny of Australian *Clevelandella* species (class Armophorea, order Clevelandellida, family Clevelandellidae), intestinal endosymbiotic ciliates in the wood-feeding roach *Panesthia cribrata* Saussure, 1864. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 60: 335–341.
- Miao, M., Shao, C., Jiang, J., Li, L., Stoeck, T., Song, W. 2009. *Caryotricha minuta* (Xu et al., 2008) nov. comb., a unique marine ciliate (Protista, Ciliophora, Spirotrichea), with phylogenetic analysis of the ambiguous genus *Caryotricha* inferred from the small-subunit rRNA gene sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 430–438.
- Modeo, L., Fokin, S.I., Boscaro, V., Andreoli, I., Ferrantini, F., Rosati, G., Verni, F., Petroni, G. 2013. Morphology, ultrastructure, and molecular phylogeny of the ciliate *Sonderia vorax* with insights into the systematics of order Plagiopylida. *BMC Microbiology* 13: 40.
- Nam, S.W., Shin, W., Kang, M., Yih, W., Park, M.G. 2015. Ultrastructure and molecular phylogeny of *Mesodinium coatsi* sp. nov., a benthic marine ciliate. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62: 102–120.
- Ng, S.F., Nelsen, E.M. 1977. The protargol staining technique: an improved version for *Tetrahymena pyriformis*. *Transactions of the American Microscopical Society* 369–376.
- Orsi, W., Edgcomb, V., Faria, J., Foissner, W., Fowle, W.H., Hohmann, T., Suarez, P., Taylor, C., Taylor, G.T., Vd’ačný, P., Epstein, S.S. 2012. Class Cariacotrichea, a novel ciliate taxon from the anoxic Cariaco Basin, Venezuela. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 1425–1433.
- Pan, B., Chen, X., Hou, L., Zhang, Q., Qu, Z., Warren, A., Miao M. 2019. Comparative

- genomics analysis of ciliates provides insights on the evolutionary history within “Nassophorea–Synhymenia–Phyllopharyngea” assemblage. *Frontiers in Microbiology* 10: 2819.
- Peck, R.K. 1977. Cortical ultrastructure of the scuticociliates *Dexiotricha media* and *Dexiotricha colpidiopsis* (Hymenostomata). *The Journal of Protozoology* 24: 122–134.
- de Puytorac, P., Batisse, A., Deroux, G., Fleury, A., Grain, J., Laval-Peuto, M., Tuffrau, M. 1993. Proposition of a new classification of the phylum of the protozoa Ciliophora Doflein, 1901. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 316: 716–720.
- de Puytorac, P., Grain, J., de Santa Rosa, M.R. 1976. A propos de l'ultrastructure corticale du cilié hypotriche *Stylonychia mytilus* Ehrbg., 1838: les caractéristiques du cortex buccal adoral et paroral des Polyhymenophora Jankowski, 1967. *Transactions of the American Microscopical Society* 95: 327–345.
- Raikov, I.B. 1982. The Protozoan Nucleus. Morphology and evolution. *Cell Biol. Monogr.* pp. 474.
- Raikov, I.B. 1985. Primitive never-dividing macronuclei of some lower ciliates. *International Review of Cytology* 95: 267–325.
- Rinke, C., Schmitz-Esser, S., Stoecker, K., Nussbaumer, A.D., Molnár, D.A., Vanura, K., Wagner, M., Horn, M., Ott, J.A., Bright, M. 2006. "*Candidatus* thiobios zoothamnicoli," an ectosymbiotic bacterium covering the giant marine ciliate *Zoothamnium niveum*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2014–2021.
- Roth, L.E. 1957. An electron microscope study of the cytology of the protozoan *Euplotes patella*. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 3: 985–1000.
- Rotterová, J., Salomaki, E., Pánek, T., Bourland, W., Žihala, D., Táborský, P., Edgcomb, V.P., Beinart, R.A., Kolísko, M., Čepička, I. 2020. Genomics of new ciliate lineages provides insight into the evolution of obligate anaerobiosis. *Current Biology* 30: 1–14.
- Ruthmann, A., Hauser, M. 1974. Mitosis-like macronuclear division in a ciliate. *Chromosoma* 45: 261–272.
- Schrenk, H.G., Bardale, C.F. 1991. The fine structure of *Saprodinium dentatum* Lauterborn, 1908 as a representative of the Odontostomatida (Ciliophora). *The Journal of Protozoology* 38: 278–293.
- Schuster, F.L., Ramirez-Avila, L. 2008. Current world status of *Balantidium coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 21: 626–638.
- Shin, M.K., Hwang, U.W., Kim, W., Wright, A.D.G., Krawczyk, C., Lynn, D.H. 2000. Phylogenetic position of the ciliates *Phacodinium* (Order Phacodiniida) and *Protocruzia* (Subclass Protocruziidia) and systematics of the spirotrich ciliates examined by small subunit ribosomal RNA gene sequences. *European Journal of Protistology* 36: 293–302.
- Small, E.B., Lynn, D.H. 1985. Phylum Ciliophora, Doflein, 1901. In: Lee, J.J., Hutner, S.H., Bovee, E.C. (eds). *An Illustrated Guide to the Protozoa*. pp. 393–575.
- Small, E.B. 1976. A proposed subphyletic division of the phylum Ciliophora Doflein, 1901. *Transactions of the American Microscopical Society* 95: 739–751.
- Small, E.B., Lynn, D.H. 1981. A new macrosystem for the phylum Ciliophora Doflein, 1901.

- Stelly, N., Halpern, S., Nicolas, G., Fragu, P., Adoutte, A. 1995. Direct visualization of a vast cortical calcium compartment in *Paramecium* by secondary ion mass spectrometry (SIMS) microscopy: possible involvement in exocytosis. *Journal of Cell Science* 108: 1895–1909.
- Stoeck, T., Foissner, W., Lynn, D.H. 2007. Small-subunit rRNA phylogenies suggest that *Epalxella antiquorum* (Penard, 1922) Corliss, 1960 (Ciliophora, Odontostomatida) is a member of the Plagiyopylea. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 436–442.
- Stoeck, T., Taylor, G.T., Epstein, S.S. 2003. Novel eukaryotes from the permanently anoxic Cariaco Basin (Caribbean Sea). *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5656–5663.
- Strüder-Kypke, M.C., Wright, A.D.G., Foissner, W., Chatzinotas, A., Lynn, D.H. 2006. Molecular Phylogeny of litostome ciliates (Ciliophora, Litostomatea) with emphasis on free-living haptorian genera. *Protist* 157: 261–278.
- Tucker, J.B. 1967. Changes in nuclear structure during binary fission in the ciliate *Nassula*. *Journal of Cell Science* 2: 481–498.
- Tucker, J.B. 1968. Fine structure and function of the cytopharyngeal basket in the ciliate *Nassula*. *Journal of Cell Science* 3: 493–514.
- Tucker, J.B. 1970. Initiation and differentiation of microtubule patterns in the ciliate *Nassula*. *Journal of Cell Science* 7: 793–821.
- Vd'ačný, P., Bourland, W.A., Orsi, W., Epstein, S.S., Foissner, W. 2011. Phylogeny and classification of the Litostomatea (Protista, Ciliophora), with emphasis on free-living taxa and the 18S rRNA gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 510–522.
- Vd'ačný, P., Orsi, W., Bourland, W.A., Shimano, S., Epstein, S.S., Foissner, W. 2011. Morphological and molecular phylogeny of dileptid and tracheliid ciliates: Resolution at the base of the class Litostomatea (Ciliophora, Rhynchostomatia). *European Journal of Protistology* 47: 295–313.
- Vd'ačný, P., Orsi, W., Foissner, W. 2010. Molecular and morphological evidence for a sister group relationship of the classes Armophorea and Litostomatea (Ciliophora, Intramacronucleata, Lamellicorticata infraphyl. nov.), with an account on basal litostomateans. *European Journal of Protistology* 46: 298–309.
- Williams, N.E., Frankel, J. 1973. Regulation of microtubules in *Tetrahymena*: I. Electron microscopy of oral replacement. *Journal of Cell Biology* 56: 441–457.
- Wright, A.D.G., Dehority, B.A., Lynn, D.H. 1997. Phylogeny of the rumen ciliates *Entodinium*, *Epidinium* and *Polyplastron* (Litostomatea: Entodiniomorpha) inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44: 61–67.
- Zhang, Q., Yi, Z., Fan, X., Warren, A., Gong, J., Song, W. 2014. Further insights into the phylogeny of two ciliate classes Nassophorea and Prostomatea (Protista, Ciliophora). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 70: 162–170.